

LUCIANA MAIA SILVA

**Análise histológica da resposta pulpar dos
caninos de gambás *Didelphis albiventris* ao
MTA (Agregado Trióxido Mineral) após
Pulpotomia**

BELO HORIZONTE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

2004

LUCIANA MAIA SILVA

**Análise histológica da resposta pulpar dos
caninos de gambás *Didelphis albiventris* ao
MTA (Agregado Trióxido Mineral) após
Pulpotomia**

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Odontologia da
Universidade Federal de Minas Gerais como
requisito à obtenção do título de mestre em
Odontologia

Área de concentração: Endodontia

Orientadora:

Prof^a Dr^a Maria Ilma de Souza Côrtes

Co-Orientador:

Prof. Dr. José Bento Alves

BELO HORIZONTE
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

2004

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Ruyter e Magna,
pelo amor e exemplo de vida – vocês são meus “Mestres” eternos.

Ao meu marido Rogério, pelo nosso amor e companherismo.

Aos meus irmãos, Ri, Beta e Cau, meus maiores amigos.

A querida Karlinha, quem me ensinou a “Odontologia arte”,
me apoiando nos primeiros passos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua presença constante em minha vida.

Ao meu querido marido, Rogério, por participar literalmente comigo deste trabalho, com grande entusiasmo. Não tenho palavras para agradecer sua presença e ajuda sempre!

Ao papai por seu grande apoio em tudo que sempre preciso, à mamãe, por seu constante incentivo.

À Prof^a Maria Ilma de Souza Côrtes, pela orientação sempre cuidadosa! Você, sempre dedicada de “corpo e alma” aos seus alunos e à sua profissão, nos oferece a segurança do sucesso. Obrigada por sua atenção e carinho.

Ao Prof. José Bento Alves pelo apoio, participação e colaboração preciosa a mim dispensada.

Ao amigo Nelson Lopes Júnior, por sua constante disposição e colaboração, indispensáveis na execução deste trabalho.

À Flavinha por sua grande ajuda, pelo convívio gostoso e pela amizade conquistada.

Agradeço também à amiga Cristiane Torres, por seu constante auxílio e sua grande boa vontade para comigo.

À Prof^a Gerluza, por sua disponibilidade e ajuda, sempre que a procurei.

Ao Valdir, da Estação Ecológica da UFMG, por seu esforço na captura dos animais.

Às minhas amigas Ana Cristina e Taia, por nossos inesquecíveis momentos juntas!
Vou sentir saudades...

Aos colegas de turma do mestrado, em especial às colegas Fernanda Tavares e Fernanda Carvalho.

Ao Sr. João, por sua contribuição na Técnica Histológica.

Obrigada à Amália e ao Bruno, do “Serviços Gerais”, por contribuírem para que tudo estivesse em ordem no consultório nos dias do experimento.

À Prof^a Kátia Lucy de Melo Matos por dividir comigo o local de trabalho e pelas orientações dadas quando precisei.

À Lídia pela grande ajuda no final, para a formatação deste trabalho.

Aos animais, imprescindíveis na pesquisa para o desenvolvimento dos biomateriais.

Ao Colegiado de Pós-graduação, na pessoa da

Prof^a Dr^a Izabela Por Deus

Aos Coordenadores da disciplina de Endodontia:

Prof^a Dr^a Maria Ilma de Souza Côrtes

(coordenadora no início do meu curso de mestrado)

e ao Prof. Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho

(atual coordenador)

Ao IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e de Recursos Renováveis) por permitirem a captura dos animais.

Ao CETEA-UFMG (Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais), por compreenderem a importância deste trabalho para a pesquisa Odontológica.

À Capes, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

As Empresas Dentsply e Ângelus responsáveis pela doação do MTA, utilizado na pesquisa.

EPÍGRAFE

“Se tivéssemos de escolher entre conhecimento e virtude, a última seria sem dúvida a melhor escolha, pois é mais valiosa. O bom coração que é fruto da virtude é por si só um grande benefício para a humanidade. O mero conhecimento, não”.

– Dalai-Lama.

*Deixemos o conhecimento mais e mais crescer
Porém que haja em nós muito respeito;
Para que mente e alma, bem afeitos,
Possam a música, como antes, fazer.*

- Alfred, Lord Tennyson

entra SUMÁRIO (2 páginas)

entra LISTA DE FIGURAS (3 páginas coloridas)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA – American Dental Association

CETEA-UFMG - Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais

CRCS - *Calciobiotic Root Canal Sealer*

EDTA – Ácido etilenodiamino tetracético

EDX – Microanalisador de dispersão de energia de RX

FDA – *Food and Drug Administration*

FO-UFMG – Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais

HC – Hidróxido de cálcio

HE – Hematoxilina - eosina

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IG – Imunoglobulina

IL – Interleucina

IRM – *Intermediate Restorative Material* (Material restaurador intermediário)

m – Metro

MEV – Microscópio eletrônico de varredura

ML – Microscopia de luz

mm – Milímetro

Mpa – Megapascal

MTA – *Mineral Trioxide Aggregate* (Agregado Trióxido Mineral)

°C – grau Celsius

P.A – Pró-análise

pH – Potencial hidrogeniônico

rpm – Rotações por minuto

Super EBA[®] - Cimento de óxido de zinco e eugenol reforçado

TGF-β - *Transforming growth factor beta* (fator de crescimento transformador beta)

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

- - menos

% - porcentagem

& - e

μ - micro ou micron ou micrômetro

+ - mais

= - igual

® - marca registrada

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar de forma descritiva a resposta histológica pulpar dos caninos de gambás da espécie *Didelphis albiventris* ao MTA (Agregado Trióxido Mineral) de duas marcas comerciais: MTA Ângelus® (Odontológica do Brasil) e ProRoot® MTA (Dentsply Tulsa Dental, Oklahoma-USA). Foram capturados cinco gambás machos, de tamanho médio na Estação Ecológica da UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais), sob autorização do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) e aprovação do CETEA (Comitê de Ética em Experimentação Animal). Destes animais, 14 dentes caninos foram selecionados para o experimento, sendo divididos em quatro grupos: o grupo 1 constituído por cinco caninos superiores esquerdos, que foram preenchidos com MTA Ângelus® (Odontológica do Brasil); o grupo 2, constituído por cinco canino superiores direitos preenchidos com ProRoot® MTA (Dentsply Tulsa Dental, Oklahoma-USA,); o grupo 3 representado como controle positivo, constituído por dois caninos inferiores direitos preenchidos com HC.PA® - Hidróxido de Cálcio Pro-análise (Lenza Farm Ltda – BH, MG); e o grupo 4 constituído por dois caninos inferiores esquerdos representando o controle negativo, nos quais não foi realizado qualquer tratamento. Após o período de observação de 60 dias, os animais foram sacrificados por overdose de anestésico, sendo as peças contendo os caninos, processadas para análise histológica de ML (Microscopia de Luz). Os cortes de 7 µm de espessura foram corados com HE (Hematoxilina-eosina). Os resultados, após avaliação histológica, demonstraram uma reação de reparo pulpar semelhante para os dois materiais experimentais, que foi caracterizada pela formação de ponte de tecido mineralizado, não tubular, tipo osteóide, contendo ilhas de tecido pulpar e inclusões de células, semelhantes a osteócitos. O tecido pulpar

remanescente apresentava características de normalidade, com leve infiltrado inflamatório. Estes resultados sugeriram que o *MTA*, de ambas as marcas comerciais foi capaz de induzir o reparo do tecido pulpar após o seu emprego em pulpotomia nos caninos do *D.albiventris*. No grupo controle positivo, nos dois dentes onde se utilizou o HC observou-se a mesma resposta histológica descrita para os grupos experimentais.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1	Hidróxido de cálcio	18
2.2	MTA (Agregado Trióxido Mineral).....	30
2.2.1	Características Físico-químicas.....	30
2.2.2	Mutagenicidade, Citotoxicidade e Biocompatibilidade	38
2.2.3	Mecanismo de Ação	43
2.2.4	Utilização no Tratamento Conservador da Polpa	45
2.3	Considerações Gerais sobre os Marsupiais	50
2.4	Considerações Gerais sobre o <i>Didelphis albiventris</i>	53
2.4.1	O Gambá como Modelo Animal Experimental	59
2.4.2	Desenvolvimento Dentário dos Marsupiais.....	61
3	OBJETIVOS	67
3.1	Objetivo Geral.....	67
3.2	Objetivos Específicos.....	67
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	68
4.1	Captura e Alojamento dos Animais.....	68
4.2	Caracterização das Amostras	69
4.3	Procedimento Operatório – Pulpotomia	69
4.4	Técnica Histológica.....	73
4.5	Parâmetros Considerados para Avaliação Histológica da Resposta Pulpar	74

5	RESULTADOS	82
6	DISCUSSÃO	89
6.1	Dos Materiais e Métodos	89
6.2	Dos Resultados	93
7	CONCLUSÕES	99
8	SUMMARY	100
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
10	ANEXOS	122

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Gambá da espécie <i>Didelphis albiventris</i>	64
FIGURA 2 - Filhotes do <i>Didelphis albiventris</i> , aproximadamente 1 semana após a migração do seio urogenital para o marsúpio	64
FIGURA 3 - Filhotes no interior do marsúpio, aderidos às papilas mamárias.	65
FIGURA 4 - Filhotes alternando as mamadas com as primeiras exposições ao meio externo, aproximadamente 50 a 60 dias. Detalhe: Filhotes aderidos às papilas mamárias.	65
FIGURA 5 - Arcadas dentárias do gambá <i>Didelphis albiventris</i>	66
FIGURA 6 - Vista do canino após dissecação. Observa-se a localização anatômica do ápice radicular em relação ao primeiro pré-molar	66
FIGURA 7 - Gambá <i>Didelphis albiventris</i> – Armadilha de captura.....	76
FIGURA 8 - Animal imobilizado sobre o aparato de cortiça, após sedação.	76
FIGURA 9 - Isolamento absoluto dos caninos superiores com o animal em decúbito dorsal.	77
FIGURA 10 - Lima <i>Quantec</i> [®] (<i>Analytic</i>) preparada.	77
FIGURA 11 - Pulpotomia – corte da polpa com lima <i>Quantec</i> [®] preparada. Detalhe: Imagem digitalizada, simulando penetração do instrumento até a região cervical.	78
FIGURA 12 - Hemorragia após pulpotomia do canino superior esquerdo.	78
FIGURA 13 - Irrigação abundante durante todo o procedimento.	79
FIGURA 14 - Aspecto da polpa radicular após completa hemostasia.	79
FIGURA 15 - Inserção do <i>MTA (Mineral Trioxide Aggregate)</i> , com auxílio de condensadores.	80

FIGURA 16 - Aspecto do MTA protegendo o remanescente pulpar.	80
FIGURA 17 - Posicionamento do animal para a tomada radiográfica.	81
FIGURA 18a - Radiografia oclusal da maxila — observa-se no canino esquerdo o aspecto radiográfico do <i>MTA Ângelus</i> [®] e no canino direito o <i>Pro-Root</i> [®] <i>MTA</i>	81
FIGURA 18b - Radiografia oclusal da mandíbula — observa-se no canino esquerdo o aspecto radiográfico do hidróxido de cálcio.	81
FIGURA 19 - Corte longitudinal da polpa do canino do <i>Didelphis albiventris</i> tratada com <i>MTA Ângelus</i> [®] . Formação de ponte de tecido mineralizado “tipo osteóide”. Observa-se: (*) <i>MTA Ângelus</i> [®] ; (*) Área basófila da ponte de tecido mineralizado próximo ao material; (*) Área acidófila da ponte de tecido mineralizado próximo ao tecido pulpar; (→) ilhas de tecido pulpar, incluídas na ponte de tecido mineralizado. Presença de infiltrado inflamatório leve e camada odontoblástica com redução do número de células — Barra de 180 µm.....	84
FIGURA 20 - Maior aumento da ponte de tecido mineralizado “tipo osteóide”, evidenciando osteoblastos ativos (em forma de chama) e inclusão de células semelhantes a osteócitos na matriz extracelular — Barra de 45µm.....	84
FIGURA 21a - Corte longitudinal da polpa do canino do <i>Didelphis albiventris</i> tratada com <i>ProRoot</i> [®] <i>MTA</i> . Formação de ponte de tecido mineralizado “tipo osteóide”. Observa-se: (*) <i>ProRoot</i> [®] <i>MTA</i> ; (*) Área basófila da ponte de tecido mineralizado próximo ao material; (*) Área acidófila da ponte de tecido mineralizado próximo ao tecido pulpar. Presença de infiltrado inflamatório leve e camada odontoblástica com redução do número de células. — Barra de 180 µm.	85
FIGURA 21b - Maior aumento da ponte de tecido mineralizado. Observa-se: (→) grupamentos pulpares incluídos na matriz mineralizada — Barra de 45 µm.	85
FIGURA 21c - Maior aumento evidenciando células “tipo osteócitos”, incluídas na matriz mineralizada.	85

- FIGURA 22 - Corte longitudinal da polpa do canino do *Didelphis albiventris* tratada com Hidróxido de cálcio. Formação de ponte de tecido mineralizado “tipo osteóide”.
- Observa-se: (*) Hidróxido de cálcio; (*) Área basófila da ponte de tecido mineralizado próximo ao material; (*) Área acidófila da ponte de tecido mineralizado próximo ao tecido pulpar. Presença de infiltrado inflamatório moderado e camada odontoblástica com redução do número de células; (O) Nota-se a diferença entre a morfologia da dentina e da ponte de tecido mineralizado formada.86
- FIGURA 22a - Maior aumento evidenciando o efeito do hidróxido de cálcio sobre a dentina: resultado da degeneração dos prolongamentos odontoblásticos nos túbulos dentinários.86
- FIGURA 23 - Maior aumento da ponte de tecido mineralizado “tipo osteóide”.
- Observa-se: (*) Dentina tubular; (*) Pré-dentina; (*) Ponte de tecido mineralizado, apresentando (→) células semelhantes a osteócitos na matriz extracelular.87
- FIGURA 23a - Maior aumento evidenciando ilha de tecido pulpar, incluído na ponte de tecido mineralizado.87
- FIGURA 24 - Corte longitudinal da polpa do canino do *Didelphis albiventris*. Observa-se dentina, pré-dentina e polpa dentária.
- (→) Numerosos vasos sangüíneos ocupam a porção central da polpa.88
- FIGURA 24a - Maior aumento evidenciando (a) camada rica em células; (b) camada sub-odontoblástica; (c) camada odontoblástica; (d) pré-dentina; (e) dentina.88

1 INTRODUÇÃO

“... a ótica social sinaliza para a preservação pulpar como primeira opção aos demais tipos de tratamentos. Entende-se que, desta maneira, tanto sob o aspecto social, como para outros, a manutenção do remanescente pulpar em condições de saúde é sempre oportuna... As famosas frases – a polpa inflamada é polpa perdida ou a polpa exposta é polpa perdida – não apresentam embasamento científico que as sustente.”

(ESTRELA & HOLLAND, 2004, p.88)

Tem sido relatado um alto índice de sucesso no tratamento conservador da polpa, principalmente em dentes anteriores permanentes de pacientes jovens após a ocorrência de lesões traumáticas (SCHRÖDER, 1972; CVEK, 1978; COX et al., 1982; FUKS et al., 1982; CAMP, 1984; KLEIN et al., 1985; HEIDE & KERKES, 1986; FUKS et al., 1987; CAVALLERI & ZERMAN, 1995; BLANCO, 1996). Este quadro tem sido possível devido à capacidade do Hidróxido de cálcio em induzir a formação de uma barreira de tecido mineralizado, que protege a polpa e mantém sua vitalidade (SOUZA & HOLLAND, 1974; HOLLAND et al., 1981).

Embora a busca por materiais e procedimentos que proporcionem um processo de cicatrização mais natural e biológico seja uma realidade no campo da terapia pulpar, o Hidróxido de cálcio tem sido, há mais de 50 anos, o material de escolha para os tratamentos pulpares conservadores, incluindo a pulpotomia. Isto se deve principalmente ao seu mecanismo de ação biológica descrito pelo Dr. HOLLAND (1966), como a ativação enzimática tecidual promovida pela fosfatase alcalina que estimula o efeito mineralizador. Apesar disto, o HC não possui propriedades mecânicas adequadas e promove uma necrose superficial, que leva a uma resposta inflamatória pulpar (HOLLAND, 1971).

COX et al. (1985) relataram ainda, que a dissolução do cimento de Hidróxido de cálcio pode ocorrer num prazo de um a dois anos. Aliado a este fato, os

autores observaram a formação de pontes de dentina incompletas que apresentavam defeitos em forma de túnel. Os autores comentaram que esta situação pode permitir que a microinfiltração, quando instalada resulte em infecção e conseqüente necrose pulpar.

Um novo material, o *MTA* vem surgindo com um mecanismo de ação semelhante ao do Hidróxido de cálcio, trazendo mais uma opção para o tratamento conservador da polpa (TORABINEJAD & CHIVIAN, 1999; BERNABÉ & HOLLAND, 1999; HOLLAND et al., 1999a; HOLLAND et al., 2001b; HOLLAND et al., 2002).

O *MTA* é um material biocompatível, desenvolvido na Universidade de Loma Linda, CA – EUA, pelo Dr. Mahmoud Torabinejad com numerosas aplicações clínicas em endodontia (ABEDI & INGLE, 1995). Foi usado experimentalmente, com sucesso, por endodontistas durante vários anos e está aprovado pela *Food and Drug Administration (FDA)* – EUA desde 1998 (TORABINEJAD et al., 1993).

Desde a sua primeira descrição, por LEE et al. (1993), o *MTA* tem sido usado em aplicações cirúrgicas e não cirúrgicas incluindo retro-obturações, capeamentos pulpare, reparos de perfurações de furca e perfurações radiculares, reabsorções e apexificações. Parece ser um material com melhores propriedades para aplicações clínicas endodônticas que envolvem reparos radiculares e formação óssea, quando comparado com outros materiais já conhecidos como o amálgama, *IRM*[®] (*Intermediate Restorative Material*), ionômero de vidro, *Super-EBA*[®] (Cimento de óxido de zinco e eugenol reforçado). O *MTA* é o material ideal para ser usado junto ao osso, por ser o único que consistentemente permite o crescimento do cimento e a formação óssea e ainda facilita a regeneração do ligamento periodontal (SCHWARTZ et al., 1999).

Alguns estudos demonstraram que as propriedades biológicas do *MTA* são compatíveis com o tecido vivo (TORABINEJAD et al., 1995f; TORABINEJAD et al., 1995g e TORABINEJAD et al., 1998). Foram observadas granulações bi-refringentes à luz polarizada e a formação de uma estrutura irregular, semelhante a uma barreira mineralizada Von Kossa positiva, próxima ao *MTA*, quando este foi colocado em tubos de dentina, que foram implantados em tecido subcutâneo de ratos (HOLLAND et al., 1999a; HOLLAND et al., 2001a; HOLLAND et al., 2002).

No entanto, são escassos os estudos experimentais realizados em animais, que demonstraram a efetividade do *MTA* em induzir a formação de ponte de tecido mineralizado, quando o mesmo foi colocado em contato direto com o tecido pulpar (PITT FORD et al., 1996; MYERS et al., 1996; JUNN et al., 1998; HOLLAND et al., 2001b; FARACO & HOLLAND, 2001; TZIAFAS et al., 2002). Neste trabalho utilizou-se o gambá da espécie *Didelphis albiventris*, que oferece algumas vantagens como animal experimental (FONSECA, 1996; PALMA, 1997 e MACHADO, 1999). O fato de ser um animal silvestre, existindo em grande número na natureza, sendo relativamente fácil sua captura e obtenção, aliado à sua ninhada de aproximadamente nove animais (RIGUEIRA et al., 1987) motivou a utilização do mesmo.

Desta forma, este estudo pretende contribuir efetivamente na avaliação da resposta pulpar de caninos do gambá *Didelphis albiventris* submetidos a Pulpotomia e protegidos com o *MTA* de duas marcas comerciais: Ângelus® e Dentsply®. Além disto, vem trazer mais uma opção para estudos experimentais na Endodontia, quando utiliza um novo modelo animal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Hidróxido de cálcio

O hidróxido de cálcio tem sido utilizado no tratamento endodôntico desde sua primeira descrição por HERMANN em 1920 para tratamento de dentes não vitais. Além disto, a linha de pesquisa desenvolvida pelo Dr. HOLLAND desde a década de 60 vem enfatizar a eficiência deste medicamento de uso endodôntico, destacando-se dentre as suas ações a capacidade de induzir a formação de tecido mineralizado e ação antimicrobiana.

São várias as aplicações clínicas do Hidróxido de cálcio na Odontologia. Este material tem sido utilizado como medicação intra-canal, no tratamento de apexificação, nos tratamentos de reabsorções e perfurações radiculares e também nos tratamentos conservadores da polpa, como em pulpotomias e capeamentos pulpares (HEITHERSAY, 1975; BURKE, 1976; CVEK, 1978).

O Hidróxido de cálcio apresenta-se como um pó branco, alcalino (pH 12.8), pouco solúvel em água (solubilidade de 1,2 g/litro de água, à temperatura de 25^oC). O material é uma base forte obtida da calcinação (aquecimento) do carbonato de cálcio, até a sua transformação em óxido de cálcio que, a partir da hidratação formará o Hidróxido de cálcio. O mecanismo de ação deste material parece estar relacionado com seu alto pH e sua dissociação em íons cálcio e hidroxila. As ações destes íons sobre os tecidos e as bactérias são responsáveis pelas propriedades biológicas e antimicrobianas desta substância. Sendo assim, o Hidróxido de cálcio apresenta duas expressivas propriedades enzimáticas, a de inibir enzimas bacterianas gerando efeito antimicrobiano e a de ativar enzimas teciduais, como a fosfatase alcalina, conduzindo ao efeito mineralizador. (ESTRELA, 1994).

Diversos trabalhos têm demonstrado a ação antibacteriana do Hidróxido de cálcio quando utilizado como medicação intra-canal e analisaram a difusão dos íons hidroxila através da dentina (TRONSTAD et al., 1981; WANG & HUME, 1988; FUSS et al. 1996; NERWICH et al. 1993; FOSTER et al. 1993; ESTRELA et al. 1995a; GOMES et al. 1996; REHMAN et al. 1996). A liberação dos íons hidroxila do Hidróxido de cálcio promove um meio com alto pH, o que possibilita a alteração da integridade da membrana citoplasmática das bactérias, levando a uma inativação irreversível de sua atividade enzimática (ESTRELA et al, 1995b).

Vários trabalhos demonstraram a participação dos íons cálcio nos processos de mineralização, como na formação de pontes de dentina, selamento biológico apical e oclusão dos túbulos dentinários. Estudos histoquímicos e análises com luz polarizada verificaram que, quando o Hidróxido de cálcio entra em contato com o tecido conjuntivo ocorre uma imediata precipitação de granulações birrefringentes à luz polarizada. Estas granulações são compostas principalmente por carbonato de cálcio (EDA, 1961; HOLLAND, 1971; HEITHERSAY, 1975; HOLLAND et al., 1978; HOLLAND et al., 1982; SEUX et al., 1991; WAKABAYASHI et al., 1993). Sendo que HEITHERSAY (1975) observou que a alta concentração de íons cálcio pode também ativar a aceleração da pirofosfatase, uma enzima que desempenha importante função no processo de mineralização.

Segundo TEN CATE (1998), a fosfatase alcalina é uma enzima hidrolítica que está associada à produção de qualquer tipo de tecido mineralizado. Embora seu mecanismo de ação não esteja bem esclarecido, sabe-se que esta enzima atua através da liberação de íons fosfato em meio alcalino. O Hidróxido de cálcio ativa a fosfatase alcalina através do seu alto pH, o que pode iniciar ou favorecer o processo de mineralização (MITCHELL & SHANKAWALKER, 1958; TRONSTAD et al. 1981).

WAKABAYASHI et al. (1993) utilizaram a microscopia de varredura e um microanalisador de dispersão de energia de RX (EDX) para avaliar o mecanismo de calcificação distrófica induzida pelo Hidróxido de cálcio no tecido conjuntivo da câmara auricular de coelho. Os autores observaram que as interações entre microvasos e o Hidróxido de cálcio ocorriam imediatamente após a sua aplicação e continuavam por 14 semanas. Nas fases iniciais houve a formação de uma camada necrótica e a precipitação rápida de cristais, formando uma barreira, que denominaram de calcificação distrófica. Observaram ainda depósito de cálcio e fósforo diretamente sobre as partículas do precipitado.

“O mecanismo de ação biológica do hidróxido de cálcio retrata a análise morfológica e histoquímica do processo de reparo da polpa dentária após pulpotomia e proteção pulpar. No momento em que o hidróxido de cálcio entra em contato direto com o tecido, ocorre uma dissociação de íons cálcio e íons hidroxila. Esses íons hidroxila, à sua vez, produzem uma desnaturação protéica, dado ao seu elevado pH. A profundidade dessa atuação varia de acordo com o tipo de hidróxido de cálcio empregado (na forma de pó, pasta hidrossolúvel ou cimento) e também em função do veículo utilizado. Em conjunto com esses íons hidroxila, penetram íons cálcio, que no limite entre o tecido desnaturado e o tecido vivo, precipitam-se na forma de carbonato de cálcio (reação dos íons cálcio com o dióxido de carbono do tecido), responsáveis pelas granulações de carbonato de cálcio, birrefringentes à luz polarizada. Essas granulações de carbonato de cálcio, sob a forma de calcita, podem ser detectadas duas horas após o contato do hidróxido de cálcio com o tecido. Observam-se também complexos cálcio proteínas, abaixo dessas granulações de sais de cálcio, amorfas, caracterizando uma área de calcificação distrófica. Nesse local está presente o material aprisionado, ou seja, células, vasos e fibras. Desta forma, pode-se caracterizar cinco zonas, como resultado do hidróxido de cálcio com o tecido pulpar: 1) zona de necrose de coagulação (correspondente à área de desnaturação protéica do tecido pulpar); 2) zona granulosa superficial (constituída por granulações grosseiras de carbonato de cálcio); 3) zona granulosa profunda (exibe finas granulações de sais de cálcio e representa uma área de calcificação distrófica). A intervalos de 2 a 48 horas, as granulações de carbonato de cálcio aumentam em número e tamanho. Também na zona granulosa profunda, os sais de cálcio continuam a ser depositados. É possível que com a desnaturação protéica da zona de necrose, ocorra a liberação de radicais ativos que atrairiam, eletrostaticamente, sais de cálcio para sua proximidade, contribuindo dessa forma para a precipitação de sais de cálcio na zona granulosa profunda. Dois dias após aplicação de hidróxido de cálcio, na zona granulosa profunda e imediações, as fibras do tecido pulpar se dispõem paralelamente ao longo eixo do dente. Abaixo da zona granulosa profunda surgem numerosas células jovens em proliferação, sendo inclusive visíveis células em mitose. Aos 7 dias, as fibras paralelas ao longo eixo do dente parecem torcidas lembrando as fibras de Van Koff. Alguns odontoblastos jovens podem ser visualizados, dispostos de modo irregular. Aos 30 dias o reparo está completo, estando presente dentina, pré-dentina e a camada

odontoblástica organizada. A ponte de tecido duro formada apresenta três camadas: granulações de carbonato de cálcio, área de calcificação distrófica e dentina; 4) zona de proliferação celular; 5) zona de polpa normal”.

(ESTRELA & HOLLAND, 2004, p.482-483)

Quando o Hidróxido de cálcio é colocado sobre o tecido pulpar ocorre um processo de reparo, caracterizado pela formação de uma ponte dentinária, protegendo o tecido exposto. (HOLLAND, 1971; SOUZA & HOLLAND, 1974; HOLLAND, 1998). Segundo COX et al.,(1992), o tecido mineralizado formado pode se apresentar como uma osteodentina, formada por osteoblastos e outras células do tecido conjuntivo, mas o mecanismo pelo qual isto acontece ainda não está totalmente esclarecido. Parece que a alta alcalinidade do material pode estimular vários sistemas enzimáticos envolvidos com a proliferação, migração, cicatrização e eventual reparo do tecido conjuntivo frouxo e a reposição dos tecidos mineralizados. De acordo com TZIAFAS (1995), o efeito cáustico do HC não gera dano permanente ao tecido pulpar; ao contrário, a irritação superficial provocada pela formação de uma zona necrótica, juntamente com a possível dissolução de fatores de crescimento da matriz , como o TGF- β parecem estar envolvidos na diferenciação celular.

Após a necrose superficial gerada pela alta alcalinidade do material, células inflamatórias migram para a camada mais profunda da polpa e removem os debris do tecido necrótico. Fibroblastos e células mesenquimais indiferenciadas se diferenciam em células “tipo odontoblastos”. Os fibroblastos sintetizam uma matriz fibrodentinária atubular, que por sua vez torna-se calcificada por minerais provenientes tanto da corrente sanguínea, quanto do material capeador. A fibronectina é expressa nesta fase do reparo, ligando-se ao Fator de crescimento (TGF- β), sendo ambos importantes para a diferenciação citológica e funcional das

células “tipo odontoblastos” (TZIAFAS, 1997). Desta forma, é possível que o Hidróxido de cálcio contribua para a criação de um ambiente favorável para o reparo tecidual, tanto pela neutralização de ácidos do local, quanto pelo seu potencial antimicrobiano (TZIAFAS et al., 2000).

EDA (1961) realizou análise histoquímica para verificar o mecanismo de formação de dentina, após proteções pulpares diretas em dentes de cães com pastas de hidróxido de cálcio, óxido de magnésio, fluoreto de zinco e de fluoreto de cálcio. Após os períodos de observação de 30 minutos a 60 dias, houve formação de dentina subjacente à camada de necrose, caracterizada pelo aparecimento de granulações extremamente finas, com reação Von Kossa positiva, sendo estas, provavelmente, originadas a partir da reação do material capeador com o dióxido de carbono tecidual.

De sua parte, HOLLAND (1971) analisou o processo de reparo da polpa dental de cães após pulpotomia e proteção com Hidróxido de cálcio. Os resultados demonstraram a presença de granulações grosseiras, dotadas de sais de cálcio, parte das quais constituídas por carbonato de cálcio sob a forma de calcita, bem como por complexos cálcio-proteínas, também Von Kossa positivos.

HOLLAND et al. (1979) realizaram pulpotomias com HC em macacos adultos. Após 30 dias do tratamento, em um dos grupos, com 20 dentes retirou-se o selamento coronário e a câmara pulpar ficou exposta ao meio bucal por 30 dias. Os resultados histológicos mostraram formação de tecido mineralizado e o tecido pulpar livre de inflamação em 17 dos 20 dentes. Houve formação de ponte incompleta de tecido mineralizado nos outros três dentes, sendo que, em apenas um ocorreu necrose pulpar. Os autores quiseram demonstrar com estes resultados, que apesar

da barreira mineralizada formada com o HC ser permeável e apresentar porosidades, ela não compromete o resultado do tratamento conservador.

PEREIRA et al. (1980) compararam o HC na forma de pó e na forma de pasta no capeamento pulpar de dentes de cães, após os períodos de dois, 30, 70 e 120 dias. Os resultados histológicos mostraram que, somente após 120 dias foram observadas pontes de tecido mineralizado. Em alguns dentes, os autores verificaram que o exame radiográfico mostrava áreas radiopacas, indicativas de formação de ponte. Entretanto, estes achados radiográficos não se confirmavam sempre nas observações histológicas. Não houve diferença entre as duas formas de aplicação do HC.

Também HOLLAND et al. (1981) estudaram o processo de reparo pulpar após pulpotomia com HC na forma de pó e de pasta em 40 dentes de cães. Trinta dias após o tratamento, os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre as duas formas do HC. Em 90% dos dentes houve formação de ponte de tecido mineralizado, protegendo o tecido pulpar que se apresentava vital e sem inflamação. Estes resultados estão de acordo com o trabalho de PEREIRA et al. (1980), quanto ao fato de não haver diferença entre o HC na forma de pó ou de pasta no reparo pulpar. Entretanto, estes autores não observavam deposição de ponte de tecido mineralizado nos períodos de 30 e 70 dias.

RUSSO et al. (1982) realizaram pulpotomias em dentes humanos com exposição pulpar por cárie e radiolucência periapical. Para a proteção pulpar utilizaram o HC ou HC associado a um corticosteróide. Os resultados foram superiores no grupo do HC + corticosteróide, mas houve reparo pulpar também em algumas amostras onde se utilizou o HC. Em ambos os grupos a resposta

histológica caracterizou-se pela presença de ponte de tecido mineralizado, variando em espessura, com menor número de canalículos dentinários que a dentina das paredes laterais. Em alguns casos a ponte apresentou-se incompleta, irregular, com inclusões celulares e projeções de tecido mineralizado para dentro do tecido pulpar.

HOLLAND et al. (1982), avaliaram o efeito dos hidróxidos de cálcio, de bário e de estrôncio, após capeamento pulpar, valendo-se de análise histoquímica de polpas dentárias de cão. Os autores relataram que, grânulos Von Kossa positivos foram formados abaixo do material capeador. Eles classificaram esses grânulos em dois tipos: grandes grânulos e pequenos grânulos. Mostraram que os grandes grânulos na área de necrose consistiam principalmente da precipitação de carbonato de cálcio originado do material capeador. Usando o cálcio como sinalizador foi demonstrado que os pequenos grânulos continham sais de cálcio originados do fluido tecidual e que os mesmos estavam localizados na região entre a área necrótica e o tecido pulpar vital. Segundos os autores, as grandes granulações birrefringentes não são observadas com outros óxidos, pelo fato da reação de precipitação somente ocorrer com hidróxidos com solubilidade similar à do Hidróxido de cálcio.

HIRSCHFELD et al. (1982) estudaram a indução de dentina reparadora após capeamento pulpar com HC em molares de ratos. Os resultados do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), após 21 e 35 dias mostraram que o processo inicial de mineralização caracterizou-se por um grande número de novas células, rodeando a matriz, rica em fibras colágenas. Em muitas áreas, havia uma abundância de vesículas presentes na matriz extra-celular. Foram observados cristais de hidroxiapatita dentro das vesículas ou dispersas na matriz. O processo seguinte caracterizou-se pelo arranjo dos cristais junto das fibras colágenas, e a

aderência de estruturas cálcicas, para formar as áreas mineralizadas. Segundo os autores, este aspecto está associado ao íntimo contato do HC com o tecido pulpar.

GOLDBERG et al (1984) analisaram as características da ponte de tecido mineralizado formada após pulpotomias com pasta de hidróxido de cálcio + paramonoclorofenol-canforado em 13 pré-molares humanos, com indicação de extração por razões ortodônticas. Para isso, utilizaram o MEV e o teste de infiltração de corante, utilizando o azul de metileno. Após o período de três a oito meses pós-tratamento, foram realizadas radiografias, que revelaram áreas radiopacas com espessuras variáveis, caracterizando a formação de pontes de tecido mineralizado. A análise ao MEV mostrou cristais com diferentes tamanhos, formas e disposição na superfície coronária da ponte dentinária. Próximo ao tecido pulpar, a ponte apresentava uma junção de esferas de cálcio e um grande número de orifícios, ovais e circulares, com diâmetro entre 20 a 250 μm . A análise de infiltração do corante azul de metileno mostrou sua invariável passagem através dos orifícios da ponte dentinária.

HOLLAND, et al. (1986) compararam o Endogel com Hidróxido de cálcio na proteção de 40 remanescentes pulpares de dentes de cães. Os resultados, após análise histológica mostraram que em 15 das 20 amostras do grupo com HC houve formação de ponte de tecido mineralizado. O tecido neoformado, de espessura variável recobria uma polpa dental remanescente, geralmente isenta de células inflamatórias. Em apenas cinco dentes ocorreu formação de ponte de tecido mineralizado parcial, com infiltrado inflamatório moderado. Já no grupo com Endogel, dos 20 remanescentes pulpares tratados 12 estavam necrosados.

TZIAFAS & MOLYUDAS (1988) compararam a reação pulpar de dentes de cães a dois métodos de colocação do HC: o usual, em que o HC é colocado sem pressão e um outro método, no qual o HC foi forçado para dentro do espaço pulpar. Os resultados histológicos foram observados após dois, 15 e 69 dias. Ficou demonstrado que o processo de reparo, caracterizado pela indução de ponte de tecido mineralizado foi mais evidente no grupo em que se forçou o HC sobre a polpa. Entretanto, a necrose superficial também ocorreu em maiores proporções com este método. Desta forma os autores ressaltaram que não é necessário forçar o material sobre o tecido pulpar, pelo contrário, isto pode acarretar um dano maior ao mesmo, embora não prejudique o processo de reparo. Estes achados mostraram a importância da necrose superficial promovida pelo HC, através de seu efeito químico sobre a polpa, no processo de indução do reparo.

DIAS et al. (1988) avaliaram histologicamente polpas de dentes de cães que foram capeadas com produtos à base de HC (Life[®], Calvital[®] e Renew[®]) e também com HC.PA. Os resultados demonstraram que todos os materiais foram irritantes ao tecido pulpar, no período inicial (30 dias), sendo que o HC.PA mostrou melhores resultados. Houve indução da formação de barreiras mineralizadas com variações na quantidade e qualidade, em ordem decrescente: HC.PA, Renew[®]–Cavital[®] e Life[®]. A barreira mineralizada formada era irregular, por vezes distrófica, incompleta, contendo grupamento pulpares.

OLIVEIRA et al. (1988) avaliaram a reação de polpas de dentes de ratos após capeamento com pastas de HC misturadas aos veículos polietilenoglicol, polietilenoglicol + iodofórmio e polietilenoglicol + óxido de zinco. Os resultados histológicos demonstraram que todas as pastas avaliadas foram irritantes para o tecido pulpar no período inicial e evoluíram para condição de reparo com o passar

do tempo (30 a 45 dias). Todas as pastas induziram à formação de barreiras mineralizadas amorfas. Estas apresentaram variações qualitativas quanto a presença de canalículos, retenção de resíduos, grupamentos pulpare e inclusões celulares. A formação de barreira completa e com maior regularidade de canalículos foi vista após os períodos de 30 e 45 dias, com as pastas de HC + polietilenoglicol e HC + polietilenoglicol + iodofórmio.

SÜBAY et al. (1995) realizaram pulpotomias em 20 dentes permanentes humanos e utilizaram, como materiais para proteção pulpar os cimentos de HC Dycal[®] e Pulpdent Multi-cal[®]. Os resultados histológicos demonstraram após quatro meses, que nos dez dentes tratados com Dycal[®] houve formação de ponte de tecido mineralizado completa, recuperação do tecido pulpar e ausência de bactérias. Seis dos dez dentes tratados com Pulpdent Multi-cal[®] formaram pontes de tecido mineralizado incompletas, sendo que quatro dentes mostravam inflamação severa e necrose, associada com a penetração de bactérias no tecido pulpar. Os autores concluíram que o tecido pulpar de dentes humanos permanentes pode promover o reparo, através da formação de uma ponte tecido mineralizado, desde que a microinfiltração seja evitada.

SOARES et al. (1995) compararam o efeito do HC.PA e da hidroxiapatita no capeamento pulpar de dezesseis dentes humanos com indicação para exodontias, por motivo ortodôntico. A avaliação histológica foi realizada após os períodos de observação de dois e trinta dias. Os resultados, após 30 dias mostraram a formação de barreira mineralizada contínua, na superfície do tecido exposto em três das quatro amostras que receberam HC.PA, enquanto que apenas uma amostra com hidroxiapatita apresentou formação de barreira mineralizada. Segundo os autores, a barreira calcificada formada caracterizava-se na sua porção mais externa,

por uma estrutura que lembra osso, ou osteóide, enquanto que na sua porção mais interna existiam células que se assemelhavam a odontoblastos. Estas células faziam contato com uma matriz não mineralizada, lembrando pré-dentina e sem esboço de canalículo dentinários. Os autores também destacam a presença de inclusões celulares na barreira mineralizada.

HIGASHI & OKAMOTO (1996) estudaram o caráter estrutural e a contribuição da zona degenerativa formada abaixo da área de necrose e o quanto a mesma pode afetar a formação de dentina reparadora em dentes de cães. No primeiro dia após pulpotomia com HC, corpos esféricos eletro-densos foram observados sob a área de necrose. A análise de difração de RX confirmou que estes corpos continham cálcio e fósforo. No terceiro dia, uma variada quantidade de pequenas granulações Von Kossa positivas foram observadas e havia também migração e proliferação de células pulpares, provavelmente, células mesenquimais adjacentes às mesmas. Com 14 dias, as amostras apresentavam, uma área uniforme Von Kossa positiva, exibindo diferenciação dos odontoblastos e formação de dentina tubular. Em contraste, em somente algumas amostras houve a formação de uma zona irregular Von Kossa positiva, exibindo formação de osteodentina.

SILVA et al. (1996) verificaram, através da histopatologia e do MEV, a reação pulpar de dentes de ratos submetidos à proteção com HC.PA. A análise histopatológica revelou que, após o período de sete dias, havia presença de infiltrado inflamatório e algum grau de necrose tecidual em todas as amostras. A área de necrose estava localizada na superfície da polpa coronária. Contrariando vários trabalhos, houve um aumento gradual do processo de necrose com o passar dos dias, culminando em necrose total da polpa com 60 dias. Neste período, observou-se também a formação de barreira de tecido mineralizado incompleta, do

tipo amorfa, sem a presença de canalículos dentinários ou qualquer semelhança com uma dentina terciária.

PINTO et al. (1999) avaliavam o comportamento do tecido pulpar frente à proteção direta com HC.PA e com hidroxiapatita sintética em 32 dentes permanentes humanos, obtidos de pacientes, com indicação de exodontias por motivos ortodônticos. Após os períodos de observação de 60, 90, 120 e 180 dias da proteção pulpar, os dentes foram processados para análise histológica. Os resultados demonstraram que a ponte dentinária formada pelo HC.PA apresentou-se mais espessa e organizada nos maiores intervalos de tempo e com aspectos semelhantes à dentina. Enquanto que a hidroxiapatita apresentou estruturas amorfas e totalmente desorganizadas. A presença de células inflamatórias para ambos os grupos foi muito discreta, em todos os intervalos de tempo, com exceção de um caso com hidroxiapatita de 180 dias, que apresentava abscesso pulpar.

Apesar do mecanismo de ação favorável pela formação de tecido mineralizado, pesquisadores têm relatado a dissolução do Hidróxido de cálcio. Embora a ponte de dentina seja considerada na literatura como indicadora de cicatrização e de sucesso do tratamento, COX et al., 1996 constataram que 89% das pontes formadas após o capeamento com HC apresentavam defeitos em túnel (porosidades) na interface polpa. Também COX et al. (1987), sugeriram que estes defeitos poderiam resultar em inflamação pulpar recorrente devido à microinfiltração bacteriana. Conseqüentemente, eles concluíram que o tratamento conservador direto com HC não seria um procedimento seguro e definitivo.

COX & SUZUKI (1994) listaram, de modo sintético as vantagens e desvantagens dos materiais à base de HC. Segundo estes autores as vantagens

deste material são: seu efeito antimicrobiano; seu alto pH, que estimula a proliferação dos fibroblastos, conseqüentemente, promovendo a cicatrização e o reparo tecidual; a estimulação de sistemas enzimáticos envolvidos nos processos de mineralização; sua capacidade de paralisar a reabsorção interna, sua estabilidade sob armazenagem, quando em sua apresentação PA (pó – pró-análise) e ainda seu baixo custo, manipulação fácil e tempo de trabalho aceitável. Como desvantagens dos materiais à base de HC, estes autores relataram: a dissolução destes materiais após um ano, em conseqüência dos procedimentos de condicionamento ácido para restaurações estéticas; suas fracas propriedades mecânicas; a falta de aderência à dentina e aos sistemas adesivos; o fato de não liberarem flúor, a formação de pontes dentinárias com defeitos em túnel e o fato de não apresentarem efeito analgésico.

Ainda hoje as propriedades favoráveis do HC são consideradas pelos pesquisadores. Entretanto, frente a algumas desvantagens, outros materiais vêm sendo estudados para o tratamento conservador da polpa dentária, dentre eles, o Agregado Trióxido Mineral (MTA), tem merecido especial atenção.

2.2 MTA (Agregado Trióxido Mineral)

2.2.1 Características físico-químicas

O *MTA* surgiu no início da década de 90, como um material experimental desenvolvido pelo Dr. Mahmoud Torabinejad, na Universidade de Loma Linda, CA – EUA. De acordo com LEE et al., (1993) ele foi primeiramente indicado como material retro-obturador e como material selador de perfurações de furca e intra-radiculares. No entanto, este material vem sendo utilizado em inúmeras outras aplicações clínicas na Endodontia sendo sua biocompatibilidade e ação em presença de

umidade as principais responsáveis pelo seu universo de indicações (ABEDI & INGLE, 1995; BERNABÉ, 2003). O *MTA* foi usado experimentalmente, com sucesso, durante vários anos, sendo em 1998, aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) –EUA.

Segundo TORABINEJAD et al. (1995c), como os íons, cálcio e fósforo são as principais moléculas do *MTA* e também os principais componentes dos tecidos dentais, o material apresenta excelente biocompatibilidade, quando em contato com os tecidos. Através de análises, os autores demonstraram que, após tomar presa, o *MTA* passa a ser constituído por óxido de cálcio, na forma de cristais discretos e por fosfato de cálcio, com uma estrutura amorfa, de aparência granular.

O *MTA* é um pó, constituído de partículas hidrofílicas de silicato tricálcio, aluminato tricálcio, óxido tricálcio, óxido de silicato, cuja presa está relacionada à presença de umidade (LEE et al., 1993; ABEDI & INGLE, 1995; SCHWARTZ et al., 1999). Além disto, outros óxidos minerais são também responsáveis por suas propriedades físicas e químicas. Cálcio e fósforo são os principais íons presentes e o óxido de bismuto é adicionado para torná-lo mais radiopaco. A hidratação do pó resulta na formação de um gel coloidal, que se solidifica em aproximadamente 3 horas. O *MTA* possui pH 12,5 semelhante ao do hidróxido de cálcio, que lhe confere também alguma propriedade antimicrobiana. Tem baixa solubilidade e boa radiopacidade. Devido a sua baixa resistência à compressão, não deve ser colocado em áreas funcionais. Suas características dependem do tamanho das partículas, relação água/pó, presença de água e inclusão de ar na mistura (ABEDI & INGLE, 1995; SCHWARTZ et al., 1999).

Em 1999, o *MTA* foi lançado comercialmente, como *ProRoot® MTA* (*Dentsply Tulsa Dental, Oklahoma-USA*). O *ProRoot® MTA* apresenta-se como um pó cinza escuro, composto principalmente de silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, ferroaluminato tetracálcico, óxido de bismuto e sulfato de cálcio hidratado. Segundo o fabricante, o *ProRoot® MTA* pode ainda conter até 0.6% de resíduos insolúveis livres como a sílica cristalina e outros elementos livres, como o óxido de cálcio e óxido de magnésio, além de álcalis sob a forma de sulfatos. Segundo o fabricante a mistura do pó com o líquido deve ser feita na proporção de 3:1, dando à mistura uma consistência arenosa e úmida (BERNABE & HOLLAND, 2003).

Desde o seu aparecimento sempre houve muito interesse da classe odontológica em conhecer a real origem e composição deste material. Tanto que WUCHERPFENNIG & GREEN, (1999) foram os primeiros autores a sugerir a semelhança do *MTA* com o cimento Portland (cimento utilizado na construção civil), tanto macroscopicamente, quanto microscopicamente pela difração de Raios-X. Além disto, ressaltaram comportamento similar entre o *MTA* e o cimento Portland, quando em testes laboratoriais em culturas de células e aplicação em polpas de dentes de ratos.

ESTRELA et al. (2000) avaliaram a composição química e ação antimicrobiana de alguns materiais de uso endodôntico, dentre eles o *MTA*. Comparando-o com duas amostras de cimentos Portland (marcas Itaú® e Liz®), observaram que o *MTA* possui os mesmos elementos químicos presentes nos cimentos Portland, possuindo ainda o bismuto, com a finalidade de conferir melhor radiopacidade.

Sendo assim no início de 2001, o fabricante do *ProRoot*[®] MTA modificou algumas informações contidas no *MSDS (Material Safety Data Sheet)* original, acrescentando que o material é composto por 75% de cimento Portland (denominação convencionada mundialmente para o cimento da construção civil), 20% de óxido de bismuto e 5% de sulfato de cálcio di-hidratado, fato este omitido até então. Considerando este fato, inúmeros trabalhos foram desenvolvidos, nos quais o MTA foi comparado ao cimento Portland.

HOLLAND et al. (2001a) estudaram a reação do tecido de ratos ao cimento Portland, *ProRoot*[®] MTA e hidróxido de cálcio, após preencher tubos de dentina com estes materiais e implantá-los no subcutâneo do animal. Os autores observaram resultados similares entre o MTA e o cimento Portland, sugerindo ainda que os três materiais empregados apresentavam mecanismos de ação semelhantes. Dando continuidade a esta linha de pesquisa HOLLAND et al. (2001b) utilizaram 26 dentes de cães, realizando pulpotomia e protegendo o remanescente pulpar com *ProRoot*[®] MTA e cimento Portland. Novamente os resultados demonstraram semelhança entre o MTA e o cimento Portland com formação de ponte completa de tecido mineralizado e ausência de processo inflamatório pulpar 60 dias após o procedimento.

BERNABÉ et al. (2002a) utilizaram o cimento Portland (Itaú[®]) e o *ProRoot*[®] MTA em retro-cavidades de dentes de cães. Resultados semelhantes entre os dois produtos foram observados. A análise histológica demonstrou deposição de tecido cementário em contato direto com o material retrobturador, caracterizando o selamento biológico.

O estudo de SAIDON et al. (2003) teve como objetivo comparar a citotoxicidade do *MTA* e do cimento Portland in vitro e in vivo. Para realizar o experimento in vitro, os autores colocaram os materiais a fresco e após a presa em cultura de células. Paralelamente, foram implantados em cavidades de tecido ósseo de mandíbulas de porcos da índia os materiais a fresco e após a presa. Os resultados não demonstraram diferenças na reação celular in vitro. Cicatrização óssea e reação inflamatória mínima foram observadas com ambos os materiais demonstrando que foram bem tolerados. Os autores concluíram que o *MTA* e o cimento Portland apresentaram a mesma biocompatibilidade e apostaram o cimento Portland como um material de custo mais baixo para ser utilizado nas retro-obturações.

A despeito da semelhança observada entre o cimento Portland de várias marcas e os dois tipos de *MTA*, relatada nos trabalhos de pesquisa “in vitro” e em animais é importante ressaltar que jamais se pode recomendar o uso do cimento Portland em seres humanos, quando retirado diretamente de sua embalagem comercial. Eticamente, é inviável seu emprego, uma vez que não está autorizado pelo Ministério da Saúde, da forma como é distribuído como material de construção (BERNABÉ & HOLLAND, 2003).

Baseados na série de estudos realizados com o *MTA*, bem como nos estudos que compararam o *MTA* com o cimento Portland, a empresa Ângelus da cidade de Londrina-Pr, chegou à fórmula do *MTA* lançando no comércio um produto nacional com a denominação de *MTA* Ângelus® (Odontológica do Brasil). De modo semelhante ao *ProRoot*® *MTA* se apresenta na cor cinza. Segundo o fabricante, o *MTA* Ângelus® possui em sua fórmula 80% de cimento Portland e 20% de óxido de bismuto e não possui o sulfato de cálcio (gesso), com o propósito de reduzir o tempo

de presa, que se dá em 10 minutos.

A natureza hidrofílica das partículas do pó do *MTA* permite que este material possa ser utilizado em presença de umidade, o que ocorre nos procedimentos clínicos, como em casos de perfurações e cirurgias paraendodônticas. Parece que a umidade presente nos tecidos age como um ativador da reação química do material. Assim, em casos em que ocorra pequeno sangramento ou mesmo em ambientes onde exista alguma umidade, o material não perde suas propriedades físicas, mantendo ainda o nível adequado de selamento marginal. Quanto à solubilidade, o *MTA* tem se mostrado resistente à dissolução pelos fluidos teciduais, mesmo após 21 dias imerso em água. De acordo com o fabricante do *ProRoot® MTA*, a solubilidade do material em água está compreendida em 0,1 a 1%, sendo considerado ligeiramente solúvel. A temperatura também pode exercer influência nas suas propriedades, pois uma vez aumentada, diminui a tensão superficial da água e desta forma a hidratação e o tempo de presa serão mais rápidos e a solubilidade do *MTA* diminuirá (TORABINEJAD et al.,1994).

Apesar da resistência à compressão não ser um fator importante para algumas aplicações clínicas do *MTA*, em outras, como nas perfurações de furca, pode ser significativa. O *MTA* apresenta menor resistência à compressão no período inicial, e esta aumenta consideravelmente com o passar do tempo. TORABINEJAD et al.,1995c observaram que 21 dias após sua manipulação o valor da força de compressão do *MTA* que era por volta de 40 Mpa passou para 67 Mpa, comparável ao do *IRM®* e *Super-EBA®*, porém significativamente menor do que o amálgama, que é de 311 Mpa. SLUYK et al. (1998) observaram também a resistência do *MTA* à tração e ao deslocamento, quando o material foi utilizado em perfurações de furca de dentes humanos extraídos. Os autores concluíram que a resistência do *MTA* ao

deslocamento foi significativamente maior em 72 horas do que em 24 horas. Quando o material apresentou ligeiro deslocamento no período de 24 horas, demonstrou também a capacidade de restabelecer a resistência ao deslocamento das paredes dentinárias. BERNABÉ & HOLLAND (2003) enfatizaram que estes resultados satisfatórios do *MTA*, relativos à resistência ao deslocamento e à tração, se relacionam mais especificamente aos princípios mecânicos de retenção aos preparos cavitários e não propriamente à sua adesividade.

Estudos demonstraram que o fato do *MTA* não permitir a infiltração bacteriana em ambientes altamente contaminados se deve principalmente à sua capacidade de selamento e não propriamente conferido pelo alto pH. Sendo assim, o *MTA* apresentou um melhor efeito antimicrobiano antes da presa, mas não foi capaz de agir sobre bactérias anaeróbias estritas (TORABINEJAD et al., 1995a; TORABINEJAD et al., 1995d).

O *MTA* é um cimento que tem como finalidade selar todos os caminhos de comunicação entre o sistema de canais radiculares (SCR) e a superfície externa do dente (LEE et al., 1993; TORABINEJAD et al., 1993; TORABINEJAD et al., 1994, e; ABEDI & INGLE, 1995; TORABINEJAD & CHIVIAN, 1999). Essa habilidade seladora do material, provavelmente se deve à sua natureza hidrofílica e à sua suave expansão quando é manipulado em ambiente úmido, prevenindo a microinfiltração bacteriana (TORABINEJAD et al., 1995c).

TORABINEJAD et al (1995b) compararam a adaptação marginal do *MTA* com os materiais: amálgama, Super-EBA® e IRM® em retro-obturações de dentes humanos extraídos. O exame ao MEV mostrou que o *MTA* foi o material que demonstrou a menor fenda junto às retro-cavidades, quando comparado com os

outros materiais.

ADAMO et al. (1999) avaliaram o selamento de materiais retro obturadores como *MTA*, resina composta, amálgama e Super-EBA® usando um modelo de microinfiltração bacteriana. Foram utilizados 60 dentes extraídos nos quais as retro-cavidades foram preparadas e preenchidas com os materiais. Os resultados demonstraram, que não houve diferença estatística significativa na proporção da microinfiltração dos cinco grupos testados, tanto em quatro, oito ou 12 semanas.

O *MTA* parece ser um material com melhores propriedades para aplicações clínicas endodônticas que envolvem reparos radiculares e formação óssea, quando comparado com outros materiais já conhecidos como amálgama, *intermediate restorative material (IRM®)*, ionômero de vidro, cimento de óxido de zinco e eugenol reforçado (*Super-EBA®*) que vêm sendo utilizados com resultados imprevisíveis. Além disto é tido como o material ideal para ser usado junto ao osso, por ser o único que, consistentemente permite o crescimento do cimento e a formação óssea e ainda facilita a regeneração do ligamento periodontal (SCHWARTZ et al., 1999).

DUARTE et al. (2003) avaliaram o pH e a liberação de íons cálcio do *ProRoot® MTA* e do *MTA Ângelus®*. Os autores observaram que, apesar de ambos os materiais possuírem um pH alcalino e promoverem a liberação de íons cálcio, nos períodos de 3, 24, 72 e 168 horas após a manipulação, os valores do pH e a liberação de íons cálcio foram maiores para o *MTA Ângelus*. Outra observação importante foi a de que a maior liberação de íons cálcio ocorreu no período de 3 horas.

2.2.2 Mutagenicidade, Citotoxicidade e Biocompatibilidade

Pouco se sabe sobre o potencial mutagênico do *MTA*. Apenas KETTERING & TORABINEJAD (1995) estudaram a mutagenicidade do *IRM*[®], *Super-EBA*[®] e *MTA*, demonstrando que nenhuma mutação ocorreu independente do material utilizado. Além disto, os testes de citotoxicidade demonstraram que o *MTA* é menos citotóxico que o *IRM*[®] ou *Super-EBA*[®], mas mais citotóxico que o amálgama, quando se usou o Teste do Ágar Revestido. Quando o método usado era o Radiocromo, o *MTA* foi o menos citotóxico de todos os materiais.

TORABINEJAD et al (1995e) analisaram a citotoxicidade do amálgama, *Super-EBA*[®], *IRM*[®] e *MTA*[®] em fibroblastos L929 de ratos. Os resultados demonstraram que o *MTA* foi o segundo material menos tóxico, tanto à fresco quanto após a presa, quando utilizou-se o método Agar Overlay. Já quando os fibroblastos foram marcados com radiocromo, o *MTA* foi o material menos citotóxico.

TORABINEJAD et al. (1995f) avaliaram a resposta tecidual após implante com *MTA* e *Super-EBA*[®] em mandíbulas de sete Porquinhos da Índia. Após 60 dias os animais foram sacrificados e observou-se que a reação tecidual foi ligeiramente melhor para o *MTA* quando comparado ao *Super-EBA*[®]. Todas as cinco amostras com *Super-EBA*[®] resultaram em formação de tecido conjuntivo fibroso; em uma das cinco amostras com *MTA* foi observado osso adjacente ao implante; todas amostras com *Super-EBA*[®] tiveram inflamação leve; três das cinco amostras com *MTA* estavam livres de inflamação; o tecido conjuntivo fibroso adjacente aos implantes com *Super-EBA*[®] era mais espesso que ao do *MTA*.

TORABINEJAD et al. (1995g) avaliaram a citotoxicidade de materiais retro-obturadores, amálgama, *Super-EBA*[®], *IRM*[®] e *MTA* utilizando fibroblastos de ratos da linhagem L929. Os resultados demonstraram que todos os materiais foram citotóxicos, quando utilizados a fresco em ordem crescente: amálgama, *MTA*, *IRM*[®] e *Super-EBA*[®]. Na análise após a presa dos materiais, a ordem mudou para: amálgama, *MTA*, *Super-EBA*[®] e *IRM*[®].

OSORIO et al. (1998) avaliaram e compararam, através de um modelo de cultura celular, a citotoxicidade de alguns materiais retro-obturadores como amálgama, Gallium F2[®], Ketac Silver[®], *MTA*, *Super-EBA*[®] e All Bond 2[®]. Foi utilizado um modelo de cultura celular de fibroblastos gengivais humanos e células L-929. Os resultados demonstraram que o *MTA* apresentou o menor nível de citotoxicidade. Gallium F2[®] mostrou pequena citotoxicidade, enquanto Ketac Silver[®], *Super-EBA*[®] e amálgama mostraram altos níveis de toxicidade, de modo semelhante ao All Bond 2[®].

TORABINEJAD et al. (1998) avaliaram as reações teciduais a implantes de *MTA* na tíbia e na mandíbula de Porquinhos da Índia e compararam tais reações àquelas ocorridas com os implantes de alguns materiais retro-obturadores como amálgama, *IRM*[®] e *Super-EBA*[®]. Os animais foram sacrificados após 80 dias. Avaliou-se o tipo de tecido adjacente aos materiais implantados, a presença de inflamação, o tipo de célula predominante e a espessura do tecido conjuntivo fibroso próximo a cada implante. O *MTA* obteve resultados mais favoráveis que os outros materiais, sendo que nenhuma inflamação foi observada; tecido duro foi observado adjacente ao *MTA* em cinco das onze amostras da tíbia e em uma das dez amostras de mandíbula; uma amostra de tíbia apresentou uma mistura de tecido

duro/esponjoso. Parece que o *MTA* oferece um substrato biologicamente ativo para as células ósseas e estimula a produção de interleucinas.

TORABINEJAD et al. (1995f) e TORABINEJAD et al. (1998) relataram a formação de cápsula de tecido fibroso, formação de cimento e também de tecido ósseo adjacente ao *MTA*, quando este foi implantado em mandíbulas e tíbias de porquinhos da Índia. A mesma resposta tecidual foi encontrada, quando a biocompatibilidade do *MTA* foi analisada em retro-obturações, onde houve a formação de cimento na região apical (TORABINEJAD et al., 1995g; TORABINEJAD et al., 1997 e HOLLAND et al., 1999b).

Vários estudos demonstraram a capacidade do *MTA* estimular a produção de citocinas em osteoblastos humanos e também sua capacidade de aderência celular. No intuito de observar se o *MTA* estimula a produção de citocinas em osteoblastos humanos e se permite uma boa aderência celular, KOH et al. (1997) examinaram uma cultura de osteoblastos da linhagem MG-63, na presença do *MTA* após a presa e em condições de umidade. Verificou-se nos resultados, que os osteoblastos apresentavam-se aderidos ao *MTA*, em seis horas e uma maior quantidade de interleucinas (IL-1 α , IL-1 β e IL-6) foram encontradas após 144 horas. O fator estimulador de colônias de macrófagos pareceu não ter sido afetado, mas manteve-se em valores altos.

Confirmando o estudo anterior, KOH et al (1998) avaliaram a citomorfologia dos osteoblastos MG-63 e a produção de citocinas na presença de *MTA* e *IRM*[®]. Os meios foram analisados para IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e fator estimulador de colônias de macrófagos. Havia diferenças marcantes na morfologia dos osteoblastos na presença de *IRM*[®] (a fresco ou após a presa), ou na presença de

MTA. Os osteoblastos crescidos na presença do *MTA* apareceram planos e aderidos ao cimento. Já na presença de *IRM*[®] apresentavam-se arredondados. O Teste Elisa mostrou níveis elevados das interleucinas na presença do *MTA*. Entretanto, quando se utilizou o *IRM*[®], elas eram raras ou inexistentes. O fator estimulador para colônias de macrófagos foi produzido independente do tipo de material usado. De acordo com os dados acima, parece que o *MTA* oferece um substrato biologicamente ativo para células ósseas e estimula a produção de IL.

MITCHELL et al. (1999) estudaram a biocompatibilidade, de três variantes de *MTA*, utilizando uma linhagem celular de osteossarcoma MG-63, para observar a sua citomorfologia e seu crescimento. O crescimento celular foi medido através do MEV e usou-se o Teste Elisa para IL-1 α , IL-6, IL-8 e IL-11 e fator estimulador de colônias de macrófagos. Os resultados demonstraram que houve um bom crescimento das células, produção de IL-6 e grandes concentrações de IL-8 na presença de *MTA*. Não houve produção de IL-1 α e IL-11. Já a produção do fator estimulador de colônias de macrófagos foi alta. Os autores sugeriram que à luz destes resultados o *MTA* demonstrou ser biocompatível podendo, portanto ser aplicado clinicamente.

A biocompatibilidade do *MTA* e o fato de não ser mutagênico, além de estimular a deposição de tecido mineralizado encorajaram seu uso em modelos animais visando a sua utilização clínica em humanos. Sendo assim, os trabalhos de HOLLAND et al. (1999a; 2001a e 2002) demonstraram que, quando o *MTA* foi implantado em tecido conjuntivo de ratos dentro de tubos de dentina, observou-se a formação de grânulos Von Kossa positivos, birrefringentes à luz polarizada. Próximo a essas granulações, havia sempre um tecido, como uma ponte de tecido

mineralizado, também Von Kossa positivo. As paredes dentinárias dos tubos exibiam nos túbulos dentinários, uma estrutura altamente birrefringente à luz polarizada, normalmente em camadas com diferentes profundidades. Resultados semelhantes a estes foram encontrados com o Hidróxido de cálcio. Desta forma, os autores concluíram que, é possível que o mecanismo de ação do *MTA*, de induzir deposição de tecido duro tenha algumas semelhanças com o do hidróxido de cálcio. Apesar de o *MTA* não conter hidróxido de cálcio em sua composição química, este possui o óxido de cálcio, que, uma vez em contato com os fluidos teciduais, vai reagir formando hidróxido de cálcio.

BERNABÉ et al. (2002b) demonstraram que o *MTA* foi o único material retro-obturador em dentes de cães com canais contaminados, que estimulou a deposição de tecido cementário proporcionando a obtenção do “selamento biológico”, à semelhança do que foi relatado por TORABINEJAD et al. (1995a) e TORABINEJAD et al., (1997). Também BERNABÉ et. al. (2002a) estudaram a influência do tipo de preparo apical realizado com o auxílio de ponta ultra-sônica ou de broca rotatória para retro-cirurgias. As cavidades foram seladas com *MTA* e com ZOE consistente. Os resultados foram analisados 180 dias depois, revelando mais uma vez a superioridade do *MTA*, do ponto de vista biológico, com material retro-obturador. Observou-se que ele foi o único material que estimulou a deposição de tecido cementário em íntimo contato com o material selador. Isto ocorreu independente dos preparos das retro-cavidades terem sido realizados com brocas ou com o ultra-som.

2.2.3 Mecanismo de Ação

Quando se observa a resposta tecidual do *MTA* comparada à do hidróxido de cálcio, alguma similaridade pode ser identificada, pois ambos parecem estimular a neoformação de tecido duro como cimento e dentina (BERNABÉ & HOLLAND, 1999).

TORABINEJAD et al. (1995c) já embasavam esta semelhança através do estudo das propriedades físicas e químicas do *MTA* observando duas fases específicas do material constituídas pelo óxido de cálcio e fosfato de cálcio. Verificaram ainda que a semelhança no mecanismo de ação entre o *MTA* e o hidróxido de cálcio estaria explicada pela presença do óxido de cálcio.

A semelhança do mecanismo de ação do *MTA* com o hidróxido de cálcio pode ainda ser avaliada, quando se observa que vários autores encontraram a presença de granulações de calcita em experimentos onde o hidróxido de cálcio foi colocado em contato com tecido subcutâneo de ratos (SOUZA et al., 1977), polpa dental (HOLLAND, 1971; HOLLAND & SOUZA, 1977; HOLLAND et al., 1982) e nos tecidos periapicais (HOLLAND et al., 1977; HOLLAND et al., 1978). Estas granulações se formam a partir da reação do cálcio do hidróxido de cálcio com o gás carbônico presente nos tecidos.

SEUX et al. (1999) descreveram estas mesmas granulações de calcita resultantes da reação do hidróxido de cálcio com carbonatos em meio de cultura de células, demonstrando ainda que a fibronectina seria o ponto de partida na formação da barreira de tecido duro. A fibronectina seria a responsável pela migração e adesão de células pulpares e periodontais que, sintetizariam e depositariam colágeno tipo I, formando a matriz orgânica celular. Além disto, esta glicoproteína

induziria a diferenciação de células pulpares em odontoblastos e células do periodonto em cementoblastos, principais responsáveis pela deposição de minerais. Quando colocavam células pulpares em contato com esse ambiente, havia neoformação de células com aspecto morfológico de odontoblastos. Na ausência de granulações de calcita havia apenas proliferação de fibroblastos.

HOLLAND et al. (1999a) mostraram a similaridade entre o Hidróxido de cálcio e o *MTA*, quando estes materiais foram empregados em tecido subcutâneo de ratos. Com ambos os materiais houve a formação de granulações de calcita e uma ponte de tecido duro subjacente. Acredita-se que o óxido de cálcio do *MTA* seria convertido em Hidróxido de cálcio ao se realizar o preparo da pasta com água. Este, por sua vez se dissociaria em íons cálcio e hidroxila, quando em contato com os fluidos teciduais. Os íons cálcio por sua vez reagiriam com o gás carbônico do tecido originando as granulações de calcita, havendo em seguida o acúmulo de fibronectina facilitando a adesão e diferenciação celular com conseqüente formação de tecido mineralizado.

Segundo SOARES (1996) e HOLLAND et al. (2001b), uma ligeira camada de necrose na superfície pulpar foi encontrada entre a ponte de tecido mineralizado e o *MTA*, fato este atribuído à ação dos íons OH. No caso do *MTA*, a necrose superficial estava na maioria das vezes ausente, sendo que quando foi observada, apresentava-se bem mais delgada do que a provocada pelo HC.

HOLLAND et al. (2002) implantaram tubos de dentina preenchidos com *MTA*, Sealapex, Calciobiotic Root Canal Sealer (*CRCS*), Sealer 26 e Sealer plus no tecido subcutâneo de ratos. Após sete e 30 dias, observaram na abertura dos tubos, a formação de grânulos Von Kossa positivos, bi-refringentes à luz polarizada.

Próximo a estas granulações houve a formação de um tecido, similar a uma ponte e também Von Kossa positiva. As paredes dentinárias dos tubos, também exibiam uma estrutura altamente bi-refringente à luz polarizada. Estes resultados foram observados para todos os materiais, com exceção do *CRCS*.

2.2.4 Utilização no Tratamento Conservador da Polpa

Inúmeros trabalhos de pesquisa têm demonstrado que, dentre os materiais indicados para a proteção da polpa exposta, o hidróxido de cálcio tem sido o de escolha, por sua capacidade de induzir a formação de uma barreira de tecido mineralizado preenchendo assim os requisitos adequados. Muito se discute atualmente sobre novas opções de materiais para esta finalidade, sendo sugeridos o *MTA*, o óxido de zinco e eugenol, o ionômero de vidro e até mesmo, sistemas adesivos dentinários. Observações clínicas e experimentais em dentes de animais e de humanos têm demonstrado, repetidamente, a formação de dentina reparadora após o capeamento com Hidróxido de cálcio (HOLLAND, 1971; SCHÖDER, 1972; HOLLAND et al., 1982; SCHÖDER, 1985; HEYS et al., 1990).

Para que se tenha um tratamento conservador pulpar efetivo, o material capeador deve ser biocompatível, promover um selamento biológico adequado e prevenir a infiltração bacteriana. Desta forma o *MTA* tem sido utilizado como material para capeamento pulpar em estudos em animais e também em humanos, e vem demonstrando ser excelente para este fim, com bastante sucesso, quando comparado com o Hidróxido de cálcio (PITT FORD et al., 1996; JUNN et al., 1998; FARACO & HOLLAND, 2001).

PITT FORD et al. (1996) compararam a resposta pulpar em dentes de macacos, quando o *MTA* e o Hidróxido de cálcio foram utilizados para capeamento

pulpar. Após o período de cinco meses, os resultados demonstraram formação de ponte de dentina espessa e contínua com a dentina original em todos os tecidos pulparem que receberam capeamento com *MTA*. Além disto, em apenas uma das amostras houve presença de inflamação. Em contrapartida, todas as amostras que receberam capeamento pulpar com Hidróxido de cálcio apresentavam-se com inflamação e, em apenas duas, ocorreu formação de ponte de dentina. Entretanto, MYERS et al. (1996) em seu estudo, também em dentes de cães, não encontraram diferenças significativas quanto ao estado pulpar e à formação de ponte, quando estes dois materiais foram utilizados como agentes de capeamento pulpar. Os autores concluíram que, ambos os materiais, tiveram comportamento semelhante, favorecendo o reparo pulpar.

JUNN et al. (1998) realizaram um estudo com o objetivo de quantificar a formação de dentina, quando o *MTA* e o HC foram usados no capeamento pulpar de 63 dentes de cães. Após os períodos de uma, duas, quatro e oito semanas, os resultados demonstraram uma diferença estatisticamente significante para ambos os materiais tanto para a quantidade de formação de pontes de dentina, quanto para o grau de inflamação. No grupo com *MTA*, 30 dos 32 dentes mostravam ausência de inflamação e formação de ponte de dentina após duas semanas do tratamento. Já no grupo com HC, apenas 13 dentes de 31 apresentavam ausência de inflamação e a formação de dentina teve início após quatro semanas. Após oito semanas, havia 21 pontes de dentina completas formadas no grupo com *MTA* e somente duas no grupo com HC.

Da mesma forma, FARACO & HOLLAND (2001) demonstraram a superioridade do *MTA* em relação ao Hidróxido de cálcio (Dycal®), quando utilizados no capeamento de polpas de cães expostas experimentalmente. No grupo com

Hidróxido de cálcio observou-se, na análise histológica, maior inflamação, uma menor frequência de formação de ponte de tecido mineralizado, infiltração de microorganismos e observação de áreas de reabsorção junto ao material. Já no grupo com *MTA*, observou-se formação de ponte de tecido mineralizado em todos os casos, ausência de inflamação e de microorganismos.

Quando HOLLAND et al. (2001b) realizaram pulpotomia em dentes de cães, protegendo a polpa remanescente com *MTA*, observaram que, após 60 dias havia presença de ponte de tecido mineralizado e ausência de inflamação em 10 das 13 raízes tratadas. As pontes revelavam estrutura tubular e mantinham a continuidade com a dentina neoformada lateralmente. Nos outros 3 dentes, os autores observaram problemas com o selamento coronário, presença de microorganismos, pontes delgadas e parciais, além de um infiltrado inflamatório.

KOH et al. (2001) relataram o uso do *MTA* como material capeador pulpar em dois pacientes, que apresentavam os segundos pré-molares inferiores com a anomalia dental “dens evaginatus”. Nos dois casos foram realizadas pulpotomias parciais, sob isolamento absoluto. A hemorragia foi contida sob irrigação com soro fisiológico esterilizado e o *MTA* foi colocado sobre o tecido pulpar, recobrimdo toda a cavidade de acesso. Dois dias depois, fez-se um desgaste no *MTA* e uma restauração com resina. Não houve qualquer sintoma clínico durante o período de seis meses pós-tratamento, quando então, os dentes foram extraídos e processados para análise histológica. Os resultados histológicos demonstraram, para ambos os dentes, a deposição de uma ponte dentinária contínua, sob o *MTA* e ausência de inflamação pulpar.

Segundo GLICKMAN & KOCH (2000) a coloração cinza do *MTA* disponível no mercado pode causar manchamento da coroa dos dentes, quando empregado em capeamentos pulpare, o que torna seu uso inconveniente do ponto de vista estético. Sendo assim, o *MTA* branco já está sendo comercializado nos Estados Unidos, o *ProRoot Reffils*[®] (*New Tooth-Colored Formula-Dentsply*) e deverá ser estudada a mesma preparação pela empresa Ângelus, no Brasil.

Seguindo seu modelo para pesquisa de biocompatibilidade dos materiais, HOLLAND et al. (2002) realizaram implante de *MTA* branco e *MTA* cinza em subcutâneo de rato. Observaram que as respostas apresentadas foram semelhantes aos seus resultados anteriores (HOLLAND et al., 1999a e HOLLAND et al., 2001a). Sendo assim, concordaram com FARACO JUNIOR (1999) quando o resultado sobre polpas de dentes de cães foi semelhante para *MTA* branco e *MTA* cinza.

TZIAFAS et al. (2002) analisaram as fases iniciais da resposta celular pulpar e da formação de dentina reparadora, após o capeamento pulpar com *ProRoot MTA*[®] em dentes de cães, durante os intervalos de uma, duas e três semanas de observação. Áreas homogêneas de estruturas cristalinas foram encontradas ao longo da interface polpa-*MTA*, enquanto as células pulpare, que mostravam alterações no seu estado morfológico e funcional, estavam arranjadas próximas aos cristais. Encontrou-se também uma deposição de tecido mineralizado, tipo ósseo, em contato direto com o material capeador, em todos os dentes. A formação de dentina reparadora foi consistentemente relacionada com uma firme área de osteodentina, indicando ser o *MTA*, um material efetivo para capeamento pulpar.

AEINEHCHI et al. (2002) compararam ambos os materiais no capeamento pulpar de terceiros molares de humanos e analisaram, histologicamente a resposta pulpar em diferentes períodos de tempo (uma semana, dois meses, três meses, quatro meses e seis meses). No geral, a avaliação histológica demonstrou menos inflamação, hiperemia e necrose; ponte de dentina mais espessa e maior frequência da camada odontoblástica quando se utilizou o *MTA*. Ressalta-se que neste caso foi utilizado um cimento de Hidróxido de cálcio (Dycal[®], L. D. Caulk, Milford, D.E., USA).

DUARTE et al. (2003) avaliaram a resposta de polpas de 14 pré-molares de cães capeadas com Hidróxido de cálcio e Pro-Root[®] *MTA*. Após o período de 60 dias, a análise histológica demonstrou uma resposta semelhante do tecido pulpar para ambos os materiais. Quando não contaminados, os materiais provocaram uma resposta inflamatória leve associada com a formação de uma nova camada de células odontoblastóides abaixo da dentina em mineralização, caracterizando a formação de ponte de tecido mineralizado sobre a ferida pulpar.

PIVA et al. (2003) estudaram a reação pulpar de 15 dentes de cães ao capeamento com o *MTA* branco. Também após o período de 60 dias, a análise histológica revelou que as polpas capeadas com o *MTA* branco exibiram reparação caracterizada pela formação de ponte de tecido duro completa em todos os espécimes estudados. Em alguns casos não havia dentina tubular, mas uma estrutura de aspecto morfológico peculiar, selando a cavidade de exposição pulpar. Além disto, com exceção de dois casos, todos os demais possuíam polpas isentas de processo inflamatório.

2.3 Considerações Gerais sobre os Marsupiais

Os marsupiais são animais mamíferos metatérios (aplacentários) que, atualmente, se distribuem pela Oceania e América. Metatérios e Eutérios representam ramos colaterais na evolução dos mamíferos, cuja diferenciação parece ter ocorrido há aproximadamente 80 milhões de anos, entre o final do Jurássico e o início do período Cretáceo (DAHBERG,1971; STONEHOUSE & GILMORE,1977). Parece, que no final deste período, os animais sofreram um processo de extinção, sobretudo no hemisfério norte, devido à incapacidade de competir com um grande número de mamíferos placentários emergentes. O *Didelphis virginiana* é uma exceção, pois desde a invasão da América do Norte sua adaptação foi possível, talvez pela ajuda do homem, que eliminou seus predadores naturais. Na América do Sul, os marsupiais parecem ter obtido maior sucesso, em função da reduzida exposição à competição por placentários, principalmente devido à carência de placentários carnívoros (DAHBERG,1971).

Os marsupiais são heterodontes, apresentando incisivos, caninos bem desenvolvidos, pré-molares e molares, cujo número, de aproximadamente 44 dentes sempre excede o número básico dos Eutérios. Na maioria desses mamíferos, o palato é fenestrado e a anatomia do cérebro difere daquela apresentada pelos mamíferos eutérios pela ausência do corpo caloso (TYNDALE-BISCOE & JANSSENS,1988).

Estes animais mostram-se excelentes para estudos ontogênicos por possuírem um breve período gestacional. Nascem em fase precoce do desenvolvimento embrionário, que se completa fora do útero, durante o período lactacional. O período gestacional dura entre oito e 40 dias e o lactacional, nove

semanas ou mais, dependendo da espécie (STONEHOUSE e GILMORE, 1977). Muitas razões têm sido propostas para explicar a precocidade do nascimento desses animais, dentre elas, a inadequação da placenta vitelínica em fornecer nutrientes e realizar trocas gasosas suficientes para a acelerada demanda do feto; a perda de proteção imunológica pelo trofoblasto; o tamanho insuficiente do útero e do canal do parto para acomodar os fetos em fases mais avançadas do desenvolvimento e ainda; a inabilidade do corpo lúteo em prolongar sua fase secretora, para manter a fase luteínica do útero. Porém, nenhuma destas razões explica adequadamente tal precocidade (TYNDALE-BISCOE & JASSENS, 1988).

Na maioria das espécies, as mamas estão no interior de uma bolsa denominada de marsúpio, que consiste em uma cavidade delimitada por pregas cutâneas, situada na parte póstero-inferior do abdome da fêmea. Porém, em algumas espécies, esta bolsa está ausente (EISEMBERG, 1989).

Apesar da extrema imaturidade ao nascer, em alguns aspectos os marsupiais são tão desenvolvidos quanto alguns mamíferos eutérios. Para alcançar o marsúpio e se fixar às papilas mamárias é necessário que o sistema locomotor do animal esteja bem desenvolvido, tornando-o apto à locomoção. Os membros anteriores são mais desenvolvidos em relação aos posteriores, pois os primeiros são mais ativos na migração. O sistema sensorial também deve estar maduro para permitir que ele encontre a bolsa, localize a teta e os músculos da língua e da boca devem estar suficientemente coordenados para permitir a sucção. Além disso, os animais têm de estar aptos a respirar o oxigênio atmosférico. O deslocamento dos pequenos embriões mobiliza principalmente os seus membros torácicos que, ao contrário de seus membros pélvicos, apresentam-se bem desenvolvidos. O marsupial neonato apresenta os dedos separados e com garras decíduas, que o

permitem agarrar-se aos pêlos da mãe e atingir as mamas. A musculatura da língua e dos lábios está bem desenvolvida para realizar a sucção, primordial à sua sobrevivência (TYNDALE-BISCOE & JASSENS, 1988).

Estudos sobre o desenvolvimento ósseo em marsupiais indicam que, alguns ossos da face associados à sucção como a pré-maxila, maxila, palatinos e a mandíbula são os primeiros a ossificarem (CLARK & SMITH, 1993).

NESSLINGER (1956) estudou os centros de ossificação durante o desenvolvimento do esqueleto do *Didelphis virginiana* e relatou que durante o nascimento, a mandíbula é o osso mais maciço do animal. Com duas semanas do nascimento, o ramo da mandíbula exibe uma forma mais definida e com 28 dias, o processo condilar já está ossificado. Neste momento tem início o desenvolvimento dentário.

Os órgãos não essenciais à sobrevivência, como os olhos e os ouvidos formam-se durante o extenso período pós-natal dentro da proteção da bolsa. Ao nascimento, também a homeotermia ainda não foi adquirida (TYNDALE-BISCOE & JASSENS, 1988). Os olhos, por exemplo, só abrirão quando se tornarem funcionais, o que acontece relativamente tarde, no período pós-natal, com aproximadamente 75 dias (CUTTS et al., 1978).

A distinção do sexo também não pode ser determinada ao nascimento, podendo ser realizada a partir do 11º dia pós-natal, quando os filhotes ainda estão no marsúpio. Esta distinção pode ser feita pela observação da ausência ou presença de um escroto rudimentar no filhote (PETRIDES, 1949).

PETRIDES (1949) estudou os gambás *Didelphis virginiana* e relatou que, quando os filhotes atingem entre 90 a 100 dias de vida, estes, tornam-se independentes das mães. Neste momento estes animais são ligeiramente maiores que ratos e têm séries dentárias ainda incompletas. Como eles têm um rápido desenvolvimento, os dentes pré-molares e molares são então adquiridos. Este mesmo autor observou que os machos desta espécie atingem um maior tamanho e peso do que as fêmeas. De um total de 48 fêmeas, nenhuma atingiu o peso acima de 3.000 gramas ou teve um comprimento de mais de 760 mm. Dos 35 machos, 7 excederam estas dimensões. Os dois maiores animais pesaram 4.734 e 4.766 gramas e mediram 820 e 840mm, respectivamente.

2.4 Considerações Gerais sobre o *Didelphis albiventris*

Segundo KIRSH (1977) a sistemática atual do *Didelphis albiventris* pode ser resumida como:

✓ REINO: Animália; FILO: Cordata; CLASSE: Mammalia; SUBCLASSE: Theria; INFRACLASSE: Metatheria; SUPERORDEM: Marsupialia; ORDEM: Polyprotodontia; SUPERFAMÍLIA: Didelphoidea; FAMÍLIA: Didelphidea; GÊNERO: *Didelphis* (LINNAEUS,1758); ESPÉCIE: *Didelphis albiventris* (LUND, 1841).

O gênero *Didelphis* foi criado por Linnaeus em 1758. De acordo com a classificação atual, os didelfídeos estão distribuídos em três espécies: *D. virginiana*, encontrado na América do Norte; *D. marsupialis*, encontrado desde o sul do México ao norte da Argentina e *D. albiventris*, encontrado desde a patagônia ao norte do Brasil e costa do Chile.

A espécie *D. albiventris* (gambá de orelha branca) é a mais comum no Brasil, sendo considerado o maior dos nossos marsupiais. É também conhecido vulgarmente como saruê ou mucura, distribuindo-se do nordeste ao sul do país, podendo ocorrer em zonas urbanas, áreas degradadas, matas úmidas e no cerrado. No cerrado, habitam desde matas de galeria, até áreas abertas como os campos (FONSECA,1982).

Em áreas naturais, pequenas e isoladas, onde houve a eliminação de seus predadores naturais (gaviões, canídeos e felinos silvestres e outros carnívoros de grande porte), os gambás podem tornar-se uma espécie de “praga”. A alta taxa de natalidade e de sobrevivência dos filhotes, aliada ao fato de serem predadores e competidores de várias outras espécies de pequenos animais, acaba por fazê-los dominar a área e eliminar outras espécies silvestres, ainda remanescentes, diminuindo a biodiversidade da região. Outra consequência dessa proliferação é a dispersão de alguns animais para áreas semi-urbanizadas e urbanas. Devido às características generalistas, tanto para alimentação como para habitação, acabam por beneficiar-se da presença humana, pois, além de se aproveitarem dos restos alimentares humanos (lixo), utilizam sótãos, telhados e outros locais como abrigo (REIS & JUAREZ, 2004).

Os gambás são capazes de se adaptar aos mais variados tipos de ambientes, inclusive ao urbano como já relatado, porém não suportam áreas muito altas, muito úmidas ou de floresta densa. São principalmente terrestres, mas também são capazes de subir em árvores. Para isso, recebem auxílio de sua cauda, que é longa e preênsil. Todas as quatro patas possuem cinco dedos separados. Nas patas anteriores, o polegar é grande, sem garras e opositor (WALKER, 1975).

Segundo WALKER (1975), os gambás são animais de porte médio (aproximadamente 1 Kg). Possuem focinho alongado e orelhas em formato de concha bem desenvolvidas. Na pele existem pêlos longos e densos destinados à proteção. Os pêlos do dorso possuem coloração acinzentada enquanto que os do ventre são brancos (daí o nome *albiventris*). Os membros anteriores são negros e a coloração da face pode variar do branco ao amarelo, possuindo uma faixa preta, que inclui os olhos. A cauda não apresenta pêlos, principalmente nos dois terços distais, sendo a base e o terço proximal de cor escura podendo variar do negro ao cinza e na porção distal a cor varia do branco ao róseo (FIG. 1).

Seu odor característico se origina de uma secreção produzida por glândulas odoríferas ou “de cheiro” localizadas a cada lado do ânus, que é expelida através de diminutas papilas. O líquido expelido pode ser dirigido ao “inimigo suspeito” e serve como mecanismo de defesa (RAMOS, 2004).

Os gambás são animais de hábito noturno e solitário. São generalistas quanto à sua alimentação, comendo desde pequenas aves, roedores, lagartos, rãs, insetos, caranguejos, cobras e também frutos e raízes (RAMOS, 2004).

Os gambás da espécie *Didelphis albiventris* diferem de outros mamíferos placentários quanto ao seu modo de reprodução e nascimento dos filhotes. Quase todos os mamíferos placentários possuem uma placenta cório-vitelínica, seguida por uma cório-alantóidea, mas os marsupiais possuem somente a primeira. O sistema reprodutor das fêmeas é duplo. Os dois úteros fundem-se em suas terminações posteriores dando origem, na época do parto, ao canal do nascimento ou vagina mediana, que se abre no seio urogenital, por onde os filhotes são expelidos durante o parto até a cloaca. Da cloaca, situada na base da cauda, os recém nascidos

deslocam-se à procura das papilas mamárias, que estão situadas na bolsa marsupial ou marsúpio. Aliás, a palavra gambá é originária da língua Tupi e significa seio oco. A estação de reprodução dos didelfídeos, em geral, ocorre no inverno e na primavera. No Brasil, este período reprodutivo do *D. albiventris* corresponde aos meses de julho a janeiro, sendo que durante cada estação reprodutiva as fêmeas produzem normalmente duas ninhadas (RIGUEIRA et al. 1987).

Assim como a maioria dos marsupiais, o período gestacional da espécie *Didelphis albiventris* é extremamente curto, sendo de 12 dias e meio a 13 dias. Nos primeiros nove dias da gestação formam-se os três folhetos embrionários; sendo que, a verdadeira organogênese ocorre durante os três últimos dias e meio do período gestacional, que corresponde à época em que a placenta fica intimamente associada ao epitélio uterino. Antes deste período, os embriões do *Didelphis albiventris* flutuam livremente dentro das secreções uterinas, envoltos em uma membrana externa, que impede a sua aderência à mucosa uterina. Durante os três últimos dias de gestação do *Didelphis* os sistemas digestivo e respiratório se desenvolvem suficientemente para permitir a sobrevivência do embrião (KRAUSE & CUTTS, 1986).

KRAUSE & CUTTS (1986) também observaram que no décimo dia pré-natal o arco mandibular e a região de formação dos olhos já são visíveis. No penúltimo dia que antecede o nascimento, a boca está bem formada, a língua projeta-se para fora da cavidade oral, o focinho, cavidades nasais e olhos estão bem estabelecidos. Pouco antes do nascimento, pode-se observar a boca lateralmente fechada e a língua retraída em sua maior parte. Nesta fase também já se pode observar a presença dos membros anteriores com diferenciação dos dedos e o processo de desenvolvimento dos membros posteriores. No décimo segundo dia de

vida, os olhos e o meato auditivo externo já estão formados e as narinas estão abertas.

Segundo BLOCK (1960), o embrião recém-nascido do *Didelphis* pode ser comparado em termos de desenvolvimento, a um feto de rato de 12 dias e a um feto humano de dois meses.

Ao nascimento, os embriões do *Didelphis* saem através do trato reprodutivo da fêmea por meio de um novo caminho formado, o canal pseudovaginal, saindo do seio urogenital para fora (KRAUSE & CUTTS, 1986). Para chegar até a bolsa, ou marsúpio, os recém nascidos utilizam-se dos seus membros anteriores bem desenvolvidos. Realizam movimentos sinuosos com o corpo, percorrendo uma região de pele levemente umedecida pela língua da mãe. Isto é possível, devido à presença das garras afiadas e decíduas que, permitem que os filhotes segurem nos pêlos da mãe. As garras caem logo depois que os recém nascidos alcançam a bolsa marsupial. Assim, eles se unem às tetas e não se sabe se os recém nascidos sugam o leite sozinhos ou se a mãe força o leite em suas bocas por contração dos músculos, situados em torno das glândulas mamárias (WALKER, 1975) (FIG. 2 e 3).

Segundo ESBÉRARD (1985) o número de filhotes no marsúpio varia de acordo com a espécie, sendo de nove animais no caso do *Didelphis albiventris*. Como normalmente o número deles é superior ao número de mamas funcionais, ocorre desde o início uma seleção dos mais aptos. Entretanto, KRAUSE & CUTTS (1986) relataram que o número de filhotes pode chegar entre 15 a 20 animais, mas que normalmente somente de oito a dez deles conseguem chegar ao marsúpio e se fixar as 13 tetas e então, sobreviverem.

CUTTS, KRAUS & LEESON (1978) observaram presença de bactérias na superfície da pele dos embriões e relataram que a periderme pode funcionar como uma barreira de proteção contra a invasão bacteriana até que o sistema imune se torne funcional.

Durante a fase de desenvolvimento intramarsúpio, os filhotes permanecem fixados às papilas mamárias por um período de 50 a 60 dias, quando começam a sair do marsúpio alternando as mamadas com as primeiras exposições ao meio externo (FIG. 4). Após 90 dias de vida, os filhotes estão aptos a sair do marsúpio, mas ainda acompanhados da mãe. A puberdade em filhotes machos criados em cativeiro tem início cerca de 200 a 210 dias após o nascimento (NOGUEIRA, 1989).

FELDMAN & ROSS (1975) ressaltaram a dificuldade em se estabelecer a idade correta destes animais. Muitas fêmeas capturadas na natureza durante o período reprodutivo podem carregar em seus marsúpios filhotes cujas idades poderão apenas ser estimadas. Uma forma de solucionar este fato seria a procriação em cativeiro, pois sabe-se que a fêmea pode entrar em um novo estro pós lactacional, ou seja, uma vez removidos seus filhotes. Neste caso, a fêmea pode ser examinada diariamente após seu contato com o macho e existe também o exame da secreção vaginal para determinar a presença de esperma. No entanto, estes autores relatam as desvantagens da procriação em cativeiro como o fato de ser muito trabalhoso, consumir muito tempo e a ocorrência da alta mortalidade entre os animais, pois tanto as fêmeas podem matar os machos, quanto o contrário também pode ocorrer.

2.4.1 O Gambá como Modelo Animal Experimental

Verificou-se que dentre os marsupiais, as espécies do gênero *Didelphis*, incluindo o gambá *Didelphis albiventris* oferecem algumas vantagens como animais experimentais, sendo muito utilizados na literatura médica, veterinária e biológica. JURGELSKI (1974) publicou, detalhadamente, em uma série de artigos sua experiência de oito anos de pesquisa, utilizando o gambá da espécie *Didelphis virginiana*, como modelo biomédico para experimentos em laboratório. As informações descritas abaixo são relatadas por este autor.

O fato destes animais nascerem em fase precoce do seu desenvolvimento e de grande parte de sua embriogênese ocorrer no interior do marsúpio, durante o período da lactação, os torna excelentes animais para estudos ontogênicos, pois permite que observações e experimentos sejam realizados sem a necessidade de intervenções cirúrgicas, ou seja, sem o sacrifício da mãe. O estágio semi-embrionário no qual nascem estes animais oferece um grande potencial para pesquisa. O estágio intra-marsúpio permite que observações diretas sejam realizadas e ainda que manipulações físicas e químicas sejam feitas nos filhotes, sem a interferência de uma barreira placentária e com mínima influência metabólica materna. Segundo o autor as observações e dados laboratoriais publicados com os gambás excedem àquelas disponíveis sobre outros marsupiais. Embora as informações citadas sejam sobre o gambá da espécie *Didelphis virginiana*, o autor declara que as mesmas podem ser cuidadosamente aplicadas para as espécies da América do Sul, como o *Didelphis albiventris*.

De acordo com as informações sobre saúde pública americana para lidar com os gambás não são necessárias medidas profiláticas especiais, apenas o uso

de luvas grossas durante sua manipulação.

Após a captura dos animais, estes podem ser mantidos em gaiolas individuais, como as utilizadas para coelhos ou gatos. A alimentação recomendada para o gambá em laboratório não é exatamente conhecida. Normalmente utiliza-se ração comercial para gatos ou cães, com um suplemento de carne fresca e ainda, frutas, como bananas. Para a apreensão do animal no momento do experimento deve-se distraí-lo pela frente com algum objeto e pegá-lo pela cauda com uma das mãos e o pescoço com a outra.

Para a realização dos experimentos o gambá pode receber desde drogas orais, como também procedimentos parenterais (injeção intra-peritoneal), intravenosos e injeções intra-musculares, sendo estas preferíveis em grandes músculos, como nos membros posteriores.

Quando capturados os gambás podem conter parasitas externos, como pulgas e carrapatos e parasitas internos, principalmente *Physaloptera sp.* Entretanto, normalmente estes parasitas não se manifestam clinicamente, quando os animais são mantidos em gaiolas individuais e em boas condições sanitárias. A mais séria doença que pode ocorrer nos gambás em cativeiro é a Endocardite bacteriana, principalmente se os animais são mantidos em locais sem condições sanitárias e aglomerados em grande número em um mesmo local, facilitando brigas entre eles, provocando mordidas, que resultam em feridas abertas. O pico de incidência da doença em animais capturados aparece rapidamente e o curso da doença é muito rápido, sendo que em um a dois dias ocorre a morte. Alguns sinais podem estar presentes como anorexia completa, letargia, icterícia e diarréia. Estas informações são muito importantes para o manejo correto dos animais durante o experimento.

2.4.2 Desenvolvimento Dentário dos Marsupiais

Metatérios e Eutérios são heterodontes e possuem duas séries dentárias, sendo que os molares pertencem à mesma série. As famílias de marsupiais, no entanto, mostram uma condição peculiar na sucessão dentária. Seus dentes não são perdidos verticalmente e sucedidos por outros dentes, com exceção de um único dente pré-molar precedido por um dente com características molariformes (PETRIDES, 1948; BERKOVITZ, 1966). Os didelfídeos mantiveram a fórmula dentária do marsupial ancestral e acredita-se que, como os demais marsupiais que possuem dentes pré-molares, apresentam substituição de um dente molariforme por outro dente que corresponderia ao terceiro pré-molar. LITTECH (1933) observou que o dente substituto no *Didelphis* desenvolve-se em série com os outros antemolares. Segundo o autor os didelfídeos têm três pré-molares funcionais, com substituição do terceiro.

A fórmula dentária dos Didelfídeos, segundo STONEHOUSE & GILMORE, (1977) é:

5	1	3	4
I	C	PM	M
4	1	3	4

Esta mesma fórmula dentária foi encontrada por AZEVEDO & GOLDBERG (1986) em seu estudo com o *Didelphis albiventris* (FIG. 5 e 6).

Segundo NESSLINGER (1956) os dentes mandibulares do *Didelphis virginiana* aparecem ligeiramente mais cedo que os maxilares, sendo que, os caninos, pré-molares e molares são os primeiros a aparecerem. Com seis a sete

semanas do nascimento, oito incisivos estão presentes na mandíbula e as diminutas cúspides do segundo molar começam a aparecer. Durante 15 a 16 semanas, minúsculos incisivos aparecem na pré-maxila. No entanto os resultados obtidos por FONSECA (1996) sobre a erupção dentária no *D. albiventris* foram diferentes quanto a época bem como para a seqüência de erupção do *D. virginiana*.

AZEVEDO & GOLDBERG (1986) realizaram o primeiro estudo, mais detalhado, sobre o desenvolvimento dentário do *D. albiventris*. Segundo estes autores, na segunda semana de vida do animal, o quarto molar é o único dente a apresentar estrutura de substituição dentária. Na terceira semana de vida, os autores descrevem o início da amelogênese no quarto molar, enquanto os outros germes dentários estariam mais atrasados, iniciando a deposição de dentina. Estes achados diferiram do trabalho realizado por FONSECA (1996), que observou a formação de lâminas dentárias secundárias em todos os dentes, com exceção dos terceiros e quartos molares. Apesar disso, a autora também verificou que estas lâminas dentárias secundárias desenvolvem-se, no máximo, até a fase de botão e entram em processo de degeneração, sugerindo que não há processo de substituição dentária no *D. albiventris*. Seus resultados mostraram que os quartos molares ainda não se encontravam presentes na mandíbula ou no maxilar. A amelogênese não foi observada nos quarto molares superiores até os 100 dias e nos inferiores iniciou-se com 80 dias de vida. A autora sugere que esta divergência de resultados seja explicada pelo fato de as idades referidas por AZEVEDO & GOLDBERG (1986) terem sido estimadas.

FONSECA (1996) também estudou o desenvolvimento dentário do *Didelphis albiventris* e observou que ao nascimento os animais já apresentavam trabéculas ósseas tanto na mandíbula quanto na maxila. O período de erupção

dentária teve início em torno de 65 dias de idade pós-natal e prolonga-se além de 100 dias (período do estudo). Além disso, o processo parece ser mais adiantado na mandíbula do que na maxila, o que está de acordo com o trabalho de PETRIDES (1949) e também com o de NESSLINGER (1956), que estudaram o *D. virginiana*.

No animal de oitenta dias de idade, FONSECA (1996) observou que os dentes mostram-se em processo de erupção, com o epitélio dentário reduzido revestindo a porção inclusa. A polpa dentária mostrava suas quatro zonas (odontoblástica, acelular, rica em células e central) bem nítidas. A lâmina dentária do canino inferior é mais profunda que as demais lâminas dentárias presentes nos animais recém-nascidos. No primeiro dia de vida, ele já se apresenta em fase de botão, atingindo a fase de capuz entre cinco e seis dias de idade. Com 80 dias de idade, o canino inferior encontra-se completamente isolado em seu alvéolo. Seu forame apical está delineado por dentina e pré-dentina e não mostra mais a camada interna da antiga bainha epitelial radicular. A lâmina dentária do canino superior é oblíqua em relação ao epitélio oral e é maior e mais espessa que as demais lâminas dentárias. Ela já pode ser encontrada na maxila em animais recém nascidos e com dois dias encontra-se em fase intermediária entre botão e capuz. O canino superior toca o epitélio de revestimento oral aos 50 dias de idade, através da extremidade da face palatina de sua cúspide. Em animais com oitenta dias, o canino superior apresenta a ponta de cúspide exposta, o epitélio do sulco gengival já está formado e a polpa muito vascularizada, com suas camadas estabelecidas. Aos cem dias a autora observou um incremento no desenvolvimento radicular do canino superior com maior espessura dos tecidos radiculares e com a parede do forame constituída por pré-dentina e dentina.

Pagina 1/3 fotos

Arquivo: figuras corretas.ppt (todas as figuras estão neste arquivo)

Pagina 2/3 fotos

Pagina 3/3 fotos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar, por meio de microscopia de luz, a reação histológica do tecido pulpar dos caninos do gambá *Didelphis albiventris*, comparando duas marcas comerciais de MTA: Ângelus® (Odontológica do Brasil) e Dentsply® (*Tulsa Dental, Oklahoma-USA*) após pulpotomia.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar por meio de microscopia de luz:

- 1) a presença e o aspecto estrutural da ponte de tecido mineralizado formada após a utilização do MTA Ângelus® (Odontológica do Brasil) e do *ProRoot® MTA* (*Dentsply Tulsa Dental, Oklahoma-USA*);
- 2) alguns aspectos estruturais da polpa após a utilização do MTA Ângelus® (Odontológica do Brasil) e do *ProRoot® MTA* (*Dentsply Tulsa Dental, Oklahoma-USA*).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Captura e Alojamento dos Animais

Neste experimento foram utilizados cinco gambás machos da espécie *Didelphis albiventris* apresentando tamanho médio, idade indefinida e peso variando entre 650 a 800 gramas. A captura dos mesmos ocorreu no período de julho a setembro de 2002 nas matas da Estação Ecológica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), conforme autorização Nº 85/2002/MG, do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), (ANEXO 1) e aprovação Nº 40/2002 do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA-UFMG), (ANEXO 2).

Para captura dos animais foram utilizadas armadilhas de ferro galvanizado medindo 100 cm x 40 cm x 40 cm, tendo como iscas amendoim e/ou pedaços de banana. As armadilhas foram montadas à tarde e recolhidas pela manhã, já que os animais têm hábito noturno (FIG. 7).

Os animais foram alojados no biotério do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB-UFMG), em gaiolas individuais e receberam diariamente todos os cuidados necessários, como alimentação constituída de ração para gato, frutas e água à vontade. Numa rotina diária, as gaiolas foram limpas, trocados os jornais, trocada a água e recolocado o alimento. Os animais foram mantidos desta forma até o momento do experimento e durante o período pós-tratamento (60 dias).

4.2 Caracterização das Amostras

Foram selecionados 14 dentes caninos de cinco gambás *Didelphis albiventris*, sendo os grupos assim distribuídos:

- ✓ grupo 1 – experimental - 5 caninos superiores esquerdos submetidos a pulpotomia e preenchidos com *MTA Ângelus*[®] (Odontológica do Brasil).
- ✓ grupo 2 – experimental - 5 caninos superiores direitos submetidos a pulpotomia e preenchidos com *Pro-Root*[®] MTA (*Dentsply Tulsa Dental, Oklahoma-USA*).
- ✓ grupo 3 – controle positivo - 2 caninos inferiores direitos submetidos a pulpotomia e preenchidos com Hidróxido de cálcio PA (Lenza Farm Ltda – BH, MG).
- ✓ grupo 4 - controle negativo - 2 caninos inferiores esquerdos sem qualquer tratamento, mantendo as características do tecido pulpar.

4.3 Procedimento Operatório - Pulpotomia

O animal foi transportado individualmente em sua gaiola, do biotério do ICB para um consultório da Faculdade de Odontologia (FO-UFMG), reservado exclusivamente para o experimento, sendo inicialmente pesado e, em seguida, anestesiado. Ainda dentro da gaiola recebeu o relaxante muscular Cloridrato de Xilazina-Calmium[®] (AGENER UNIÃO, União Química Farmacêutica Nacional S/A) na dosagem de 0,15 ml/kg de peso corpóreo do animal. Com o animal já sedado procedeu-se à aplicação do anestésico Cloridrato de Tiletamina + Cloridrato de Zolazepan-Zoletil 50[®] (VIRBAC) na dosagem recomendada de 0,2 ml /kg de peso. A anestesia foi injetada no músculo de um dos membros posteriores do animal, como recomendado por JURGELSKI (1974), com seringa para injeção de insulina (B-D

1 cc agulha longa). Quando necessário realizou-se a complementação da anestesia, conforme recomendado pelo fabricante, cerca de um terço à metade da dose inicial. Em seguida foram realizadas radiografias oclusais tanto para a arcada superior quanto para a inferior, utilizando-se Filme Kodak (Dental Intraoral E - Speed filme Size 2).

Todo o instrumental utilizado foi previamente autoclavado a 121°C por 30 minutos e a bandeja clínica foi organizada de modo a facilitar o procedimento operatório.

O animal foi, então colocado sobre a bancada de trabalho em um aparato de cortiça especialmente confeccionado para esta finalidade, sendo imobilizado com um pano de campo fixado com alfinetes (FIG. 8). Foram realizados primeiramente os caninos superiores, estando o animal em decúbito dorsal. Para os caninos inferiores foi adotada a posição contrária. A boca do animal foi mantida aberta através de um dispositivo que apreendia a arcada oposta à experimental através de um elástico, sustentado por uma pinça fixada ao aparato de cortiça.

Em seguida ao posicionamento do animal, o isolamento absoluto foi realizado simultaneamente para os dois dentes a serem operados em cada arcada e os locais correspondentes aos mesmos foram perfurados com pinça (DUFLEX-SS-WHITE). Para manter o lençol de borracha em posição adequada, o mesmo foi esticado e fixado ao aparato de cortiça através de alfinetes previamente autoclavados. Em seguida era inspecionada a posição do lençol de borracha em relação aos dentes e algumas gotas de *Super-Bonder*[®] colocadas na região cervical com a finalidade de colar o lençol ao esmalte (FIG. 9). Esta medida foi adotada em substituição ao grampo, uma vez que o dente do animal é extremamente expulsivo.

Todo o cuidado foi tomado para que a *Super Bonder*[®] não escoasse para a região da gengiva do animal. A antissepsia da área foi realizada com álcool iodado a 0,3% (LenzaFarm Ltda – BH, MG) neutralizado com álcool-éter (LenzaFarm Ltda – BH, MG), em partes iguais.

Todas as etapas, desde a abertura coronária até a restauração final foram realizadas por um único operador, auxiliado por uma equipe. Inicialmente, o exame clínico foi realizado para verificar a normalidade das estruturas dentárias e periodontais. A técnica de pulpotomia seguiu estritamente o protocolo indicado para a prática clínica, com remoção da polpa coronária até o nível cervical (FIG. 11). Devido ao longo comprimento da coroa, para o acesso à câmara pulpar, um desgaste foi realizado inicialmente na ponta da cúspide com uma broca diamantada nº 2067 (KG SORENSEN Indústria e Comércio Ltda.), utilizada com suaves toques, em posição perpendicular ao longo eixo do dente, até que ocorresse a exposição de um pequeno ponto da polpa. Uma lima Quantec (*Analytic Endodontics*) LX taper 12 # 25 foi preparada previamente à sua esterilização, removendo-se 4 mm de sua ponta (FIG. 10). Este preparo permitiu que o instrumento cortasse a polpa coronária até o nível cervical, ampliando simultaneamente a cavidade de acesso e removendo estrutura dentária. O instrumento foi utilizado no sistema rotatório TC Motor[®] 3000 (NOUVAG AG) em 500 rpm. Durante todo o preparo com instrumental cortante em rotação foi realizada abundante irrigação com solução fisiológica estéril a 0,9% SANOCLEAR[®] (Laboratório Sanobiol Ltda, Pouso Alegre, MG) diretamente sobre o local de atrito do instrumento com o dente. Este procedimento foi realizado pelo operador auxiliar utilizando seringa descartável (INJEX – Ourinhos, SP) e agulha 25 x 6 (INJEX – Ourinhos, SP). A irrigação abundante ao mesmo tempo que impedia que o calor gerado provocasse dano aos tecidos, promovia a remoção dos debris de

esmalte e dentina e também a eliminação do coágulo sanguíneo. Todo o cuidado foi tomado para evitar o deslocamento da polpa radicular. A hemorragia pulpar foi controlada através de abundante irrigação (FIG. 12 e 13) e da utilização de bolinhas de algodão esterilizadas compatíveis com o tamanho da cavidade e de cones de papel absorvente esterilizados de número 80, marca TANARI (Tanariman Indústrias Ltda, Manacapuru, AM) (FIG. 14).

Cada canino recebeu a seguir o material que lhe fora determinado, conforme descrito na caracterização da amostra. Ambas as amostras de *MTA* foram manipuladas de acordo com o fabricante, sendo o pó misturado à água destilada esterilizada, na proporção de três porções de pó para uma de água destilada. O Hidróxido de cálcio foi misturado à água destilada esterilizada até a consistência adequada. Os materiais foram colocados sobre o tecido pulpar remanescente, através do uso de condensadores ODOUS[®] e KONNE[®] (Indústria e Comércio de Materiais Odontológicos – BH, MG) sem exercer pressão, mas de forma a permitir o contato direto do material com o tecido pulpar. A profundidade de penetração do condensador foi controlada através da marcação presente no mesmo (FIG. 15 e 16). Os caninos superiores dos cinco animais receberam o *MTA*, sendo o canino esquerdo preenchido com *MTA* Ângelus[®] (Odontológica do Brasil) e o direito, com *Pro-Root*[®] *MTA* (Dentsply Tulsa Dental, Oklahoma-USA). Os caninos inferiores direitos de dois animais foram preenchidos com Hidróxido de cálcio PA e os caninos esquerdos inferiores não sofreram qualquer intervenção, ficando como controle. As cavidades de acesso foram seladas com um material provisório resinoso fotopolimerizável Tempit[®] (DFL Indústria e Comércio Ltda), em forma de monodose (contendo 0,4 g), preenchendo toda a cavidade com o auxílio de pontas inseridas na seringa CENTRIX[®] (DFL Indústria e Comércio Ltda) e adaptada através de espátulas

para resina *Thompson*[®] (*Dental MFG. CO. USA*). Este material não requer o condicionamento das paredes cavitárias, nem a colocação de selante, conforme a orientação do fabricante. Utilizou-se o aparelho Foto-Optilight 600[®] (Gnatus) para a polimerização do mesmo por 20 segundos. Novas radiografias foram tomadas após o término do procedimento operatório (FIG. 17, 18a e 18b).

Após o experimento, o animal foi levado ao biotério onde foi identificado juntamente com sua gaiola e mantido em cativeiro por um período de 60 dias. Diariamente todos os cuidados com sua alimentação e hidratação foram tomados. Decorrido o período de 60 dias, foram realizadas radiografias oclusais para a verificação da imagem radiopaca da barreira de tecido mineralizado. Em seguida, o animal foi sacrificado com overdose do anestésico, decapitado, sendo as cabeças colocadas imediatamente em solução de formalina neutra tamponada a 10% por 72 horas.

4.4 Técnica Histológica

Após o sacrifício dos animais, as amostras foram processadas para observação em Microscopia de Luz.

As peças foram diminuídas em maxila e mandíbula e fixadas em formalina neutra tamponada a 10% por 72 horas. Depois, as mesmas foram lavadas em água corrente por 30 minutos e então já imersas em solução de EDTA a 10%, pH 7,2 para a promoção da desmineralização. Durante este período as peças foram cada vez mais reduzidas, ficando inicialmente os blocos cirúrgicos dente-periápice, sendo depois removidos os dentes. A solução de EDTA a 10% foi trocada semanalmente para melhorar e acelerar o processo de desmineralização, que durou aproximadamente dois meses. Cada canino foi colocado em um vidro âmbar de

boca larga, que já continha a solução de EDTA. Os vidros foram numerados e identificados de acordo com o protocolo seguido no Laboratório de Morfologia.

Após a desmineralização os espécimes foram novamente lavados em água corrente, “overnight” e então desidratados em série alcoólica crescente (70 - 80 – 90) por 30 minutos cada. Depois passaram por três banhos em álcool absoluto (álcool etílico a 100%) por uma hora cada. Em seguida os dentes foram diafanizados em três banhos de xilol, também por uma hora. Todos os espécimes foram então, submetidos a três banhos de parafina por aproximadamente uma hora e depois incluídos, sendo o dente colocado com a porção vestibular apoiada no fundo do recipiente destinado à inclusão. Foram obtidos cortes histológicos seriados com 7 μ m de espessura através do Micrótomo (LEICA RM 2125 RT) cedido pelo Laboratório de Biologia Molecular da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUCMINAS). Os cortes foram colocados em lâminas previamente silanizadas e então corados com Hematoxilina / eosina. Foram realizadas 15 lâminas para cada canino. As lâminas foram analisadas e fotografadas no Fotomicroscópio Olympus BX 50[®]. Para as fotografias, foi utilizado o filme KODAK[®] Ultra Asa 400.

4.5 Parâmetros considerados para Avaliação Histológica da Resposta Pulpar

Os parâmetros avaliados neste trabalho foram baseados nos encontrados na literatura, como os analisados por FARACO & HOLLAND (2001), HOLLAND (2001), SILVA (2003), com algumas modificações. Foram analisadas:

1. Formação de tecido mineralizado (ponte de tecido duro) em contato com o tecido pulpar e suas características: tipo de tecido formado, espessura deste tecido, células presentes e matriz extracelular.

2. Características da polpa dentária remanescente

2.1 Resposta inflamatória:

- ✓ Tecido pulpar normal sem resposta inflamatória evidente;
- ✓ presença de infiltrado inflamatório leve, com leucócitos polimorfonucleares ou mononucleares dispersos;
- ✓ presença de infiltrado inflamatório moderado a denso, envolvendo a área subjacente à exposição;
- ✓ presença de infiltrado inflamatório severo, com presença de abscesso.

2.2 Presença ou não de áreas hemorrágicas no tecido pulpar.

2.3 Organização do tecido conjuntivo pulpar:

- ✓ .aspecto normal do tecido pulpar, com preservação da pré-dentina e das camadas histológicas (odontoblástica, subodontoblástica e central);
- ✓ Alterações leves do tecido pulpar, como diminuição da camada odontoblástica, retração do tecido pulpar.

Pagina 1/6 fotos

Pagina 2/6 fotos

Pagina 3/6 fotos

Pagina 4/6 fotos

Pagina 5/6 fotos

Pagina 6/6 fotos

5 RESULTADOS

Através da análise descritiva dos resultados, observou-se uma grande semelhança no efeito de ambos os materiais sobre o tecido pulpar. A análise histológica revelou, tanto para o *MTA Ângelus*[®] (FIG. 19 e 20), quanto para o *ProRoot*[®] *MTA* (FIG. 21a, 21b e 21c) a formação de uma ponte de tecido mineralizado bem definida, de espessura variada, mas consistente. A ponte mineralizada caracterizou-se por um tecido ósseo imaturo (osteóide), onde células, semelhantes a osteócitos, encontravam-se aprisionadas na matriz extra-celular. Além disso, apresentava-se em íntimo contato com a dentina, sendo interessante salientar a diferença na morfologia entre os tecidos. A matriz do tecido mineralizado formado caracterizou-se por apresentar-se basófila, hialinizada, na região em maior contato com os materiais e acidófila nas regiões mais distantes. Na superfície da ponte formada apareceram células com morfologia típica de osteoblastos ativos (em forma de chama) e em algumas áreas foi possível observar também células com morfologia de osteoblastos pouco ativos, com aspecto fusiforme. No interior da ponte de tecido mineralizado apareceram ilhas ou grupamentos pulpares. O tecido pulpar subjacente à ponte apresentava-se com um aspecto de normalidade, bastante vascularizado, estando os vasos sanguíneos bem dilatados e com áreas de hemorragia. Pôde-se observar também um infiltrado inflamatório leve, caracterizado por leucócitos polimorfonucleares ou monucleares dispersos. Dentre as células observadas apareceram células com forma estrelada sugerindo fibroblastos e outras com aspecto mais alongado, sugerindo fibrócitos ou células mesenquimais indiferenciadas. Contornando o tecido pulpar verificou-se uma redução em espessura da camada de células “tipo odontoblastos”, demonstrando uma diminuição do número de células, devido ao procedimento clínico e também um

descolamento desta camada da pré-dentina. A pré-dentina apresentava-se preservada e em algumas áreas, a dentina perdeu seu aspecto tubular, aparecendo como uma região rósea clara, devido à “dissolução dos túbulos dentinários”, ou seja, uma área de degeneração dos prolongamentos odontoblásticos, promovida possivelmente pela hialinização provocada pelo *MTA*.

Não houve diferença significativa no padrão histológico observado nos dois dentes do grupo controle positivo com HC. No entanto, observou-se um infiltrado inflamatório mais intenso e, também maiores áreas de hialinização caracterizadas pela degeneração dos prolongamentos odontoblásticos nos túbulos dentinários, quando este material foi utilizado (FIG. 22, 22a, 23, 23a).

O grupo controle negativo no qual não se realizou o tratamento demonstrou as características histológicas da polpa dentária normal do gambá *Didelphis albiventris* (FIG. 24 e 24a).

Pagina 1/5 fotos

Pagina 2/5 fotos

Pagina 3/5 fotos

Pagina 4/5 fotos

Pagina 5/5 fotos

6 DISCUSSÃO

6.1 Dos Materiais e Métodos

Na pesquisa odontológica é inédita a utilização do *Didelphis albiventris* como modelo animal experimental até o momento, sendo raros os trabalhos encontrados na literatura sobre as características da sua dentição. Destacam-se os trabalhos de AZEVEDO & GOLDBERG (1986) e FONSECA (1996). A sua escolha para este estudo foi devida ao interesse em se testar um novo modelo experimental como opção para a pesquisa de biocompatibilidade dos materiais utilizados na Odontologia. Além disto, o trabalho segue a linha de pesquisa desenvolvida pelo Prof. Dr. José Bento Alves, no Laboratório de Morfologia do ICB-UFMG. Embora sejam animais silvestres, os gambás *Didelphis albiventris* podem ser utilizados como modelo experimental, em laboratório, pois seu manejo é relativamente simples e apresentam vantagens descritas anteriormente. A sua utilização vem trazer uma opção para este tipo de experimento, realizado normalmente em cães, que são animais domésticos. Aliado a isto, os gambás são animais heterodontes, possuindo dentes com tamanho razoável, sobretudo os caninos, semelhantes aos dos cães, o que facilita a pesquisa odontológica.

JURGELSKY (1974) relatou sua ampla experiência na utilização do *Didelphis virginiana* como modelo biomédico para experimentos laboratoriais. Segundo ele, as mesmas características se aplicam ao *Didelphis albiventris*, sendo que estes animais mostram-se excelentes para estudos ontogênicos, permitindo que observações sejam realizadas sem a necessidade de sacrificar a fêmea. Além disto oferecem uma série de vantagens como animais experimentais por apresentarem um breve período gestacional, gerar uma ninhada relativamente grande e existirem em grande

número na natureza, sendo fácil a sua captura. Os cuidados com o animal foram relativamente simples, bastando mantê-los em gaiolas individuais bem higienizadas, e alimentá-los com ração para gatos e frutas como recomendado por JURGELSKY (1974).

Neste estudo, não foi possível determinar a idade exata dos animais, dificuldade esta já relatada por FELDMAN & ROSS (1975). A reprodução em cativeiro poderia solucionar este problema, pois permitiria acompanhar as fêmeas examinando diariamente a bolsa marsupial ou ainda, a secreção vaginal para detectar a presença do esperma e, então determinar o momento exato de sua fecundação. Entretanto, devido ao alto custo para a manutenção destes animais em cativeiro, além da alta mortalidade por agressões mútuas entre machos e fêmeas quando assim mantidos, como foi relatado por FELDMAN & ROSS (1975), optou-se por não procriá-los em cativeiro. Contudo, houve facilidade na captura dos animais, bastando, para isto, que as gaiolas fossem cuidadosamente distribuídas na Estação Ecológica da UFMG no período de julho a janeiro, conforme recomendado por RIGUEIRA et al. (1987). Para este trabalho foram selecionados apenas machos, sendo este critério informado à pessoa responsável pela captura dos animais. A justificativa foi manter a fêmea para a reprodução preservando assim a espécie e, portanto o equilíbrio ecológico.

De acordo com JURGELSKY (1974) a saúde pública americana não recomenda cuidados especiais para o manuseio do animal, apenas o uso de luvas grossas durante a sua manipulação. Da mesma forma que para outros animais experimentais foram encontradas algumas dificuldades no momento da apreensão do animal antes da sedação, que se mostrava bastante agitado e parecia amedrontado quando da aproximação.

No tocante à sedação do animal, não foi observada qualquer dificuldade, possibilitando o tempo necessário de trabalho com a dosagem do relaxante muscular Cloridrato de Xilasina, associado ao anestésico Cloridrato de Tiletamina/ Cloridrato de Zolepan, com injeção no músculo de um dos membros posteriores, seguindo o modelo recomendado por JURGELSKY (1974). Entretanto, acredita-se que a realização de uma anestesia mais profunda teria sido mais satisfatória, uma vez que permitiria o tratamento de um maior número de dentes, utilizando-se um menor número de animais.

Foram feitas tentativas de tomadas radiográficas periapicais utilizando filme infantil inteiro e cortado pela metade. Entretanto, devido à ausência de uma definição do fundo de saco do vestíbulo, não foi possível a inserção do filme, sendo que o único tipo de radiografia viável foi a oclusal. Apesar do local e aparelho de radiografia terem sido específicos para o manuseio do animal, todos os cuidados com a biossegurança foram tomados. Durante o procedimento, o cone do aparelho de radiografia foi envolvido com plástico para evitar o contato com o animal. Da mesma forma, o animal era mantido em uma bandeja forrada com pano de campo durante a tomada radiográfica.

Quanto à imagem radiográfica, o canino apresentou maior nitidez, pois o ângulo de incidência na radiografia oclusal dificultou a visualização dos outros elementos, principalmente na arcada superior.

A seleção dos dentes caninos foi devida à anatomia deste elemento dental já relatada por AZEVEDO & GOLDBERG (1986); FONSECA (1996). Além disto o canino apresenta uma polpa volumosa e por ser um dente anterior permite um acesso mais fácil. Após a sedação do animal foi possível verificar, na radiografia

que os dentes apresentavam-se ainda com a rizogênese incompleta. Para todos os animais, observou-se o forame aberto, e, apesar de não se saber a idade exata, especulou-se que se tratavam de gambás jovens.

O exame clínico foi realizado para a observação da normalidade dos tecidos bucais, tanto dentários, quanto periodontais como critério de inclusão dos animais. Sendo assim, evitou-se que qualquer alteração pudesse interferir nos resultados.

Neste estudo, foram adotadas as mesmas normas utilizadas para um tratamento endodôntico convencional, realizando todo o procedimento sob isolamento absoluto, conforme recomendado por COSTA (2001). Isto foi possível através de um aparato específico utilizado para manter a abertura de boca e o isolamento em posição, o que facilitou o procedimento operatório.

Sendo assim, foram adaptados instrumentos, incluindo a preparação de uma lima rotatória. Esta preparação permitiu que o instrumento se tornasse cortante em sua ponta, de modo a permitir a ampliação da cavidade de acesso à polpa radicular. Durante o procedimento de abertura o canal foi copiosamente irrigado com soro fisiológico esterilizado, visando impedir o calor gerado pelos instrumentos acionados a motor.

O controle da hemorragia é um fator essencial durante a técnica de pulpotomia. O material capeador deve estar em contato direto com a polpa para estimular a regeneração dos odontoblastos. O coágulo sanguíneo, se deixado, impede o contato direto entre o material e a polpa, além de funcionar como substrato potencial para o crescimento bacteriano, podendo resultar em inflamação pulpar crônica, com reabsorção interna ou necrose (STANLEY, 1998). A irrigação

abundante permitiu não só a remoção do coágulo, como também dos debris de esmalte e dentina, que poderiam impedir um contato adequado dos materiais com o remanescente pulpar.

O preparo da lima Quantec[®], tornando sua ponta cortante permitiu a remoção da polpa coronária, sem o deslocamento da polpa radicular, como observado logo após o procedimento. Além disto, a abertura permitiu criar espaço suficiente para a utilização dos condensadores previamente medidos, facilitando assim, a colocação do material junto ao remanescente pulpar. A manipulação e inserção das amostras de *MTA* obedeceram às instruções do fabricante.

O selamento provisório das cavidades foi realizado com resina *Tempit*[®] KAZEMI et al. (1994) relataram a penetração do corante azul de metileno no corpo da resina *Tempit*[®], quando utilizada como material selador temporário para endodontia. Entretanto, GODOI & VIEIRA (2002) em um estudo que avaliou a penetração de bactérias demonstraram que a resina *Tempit*[®] apresentou a menor infiltração na interface dente/material, sendo superior aos materiais: *Coltosol*[®], *Pulpo Sam*[®] e *Vidrion R*[®].

6.2 Dos Resultados

A opção por se comparar duas marcas comerciais de *MTA* - *Ângelus*[®] e *Dentsply*[®] - na pesquisa em polpas de animais, foi devido ao fato de existirem poucos estudos neste sentido. Além disto, é o primeiro trabalho que utilizou o *MTA Ângelus*[®], um produto nacional, em pulpotomia, contribuindo assim para maiores informações sobre este material. Os resultados demonstraram que as duas marcas comerciais de *MTA*, utilizadas neste estudo, apresentaram uma resposta tecidual

semelhante, demonstrando formação de uma barreira de tecido mineralizado tipo “osteóide” contendo ilhas de tecido pulpar e inclusões de células semelhantes a osteócitos em contato com o tecido pulpar.

TZIAFAS et al. (2002) analisaram as fases iniciais da resposta pulpar, após o capeamento com *ProRoot® MTA (Dentsply)* em dentes de cães. Os autores relataram resultados semelhantes aos deste estudo, observando deposição de tecido mineralizado, tipo ósseo, em contato direto com o material capeador, em todos os dentes.

Entretanto, na maioria dos experimentos, o relato dos resultados evidenciou a presença de estrutura mineralizada com aspecto semelhante ao da dentina. Exemplo disto é o trabalho de HOLLAND et al. (2001b) que realizaram pulpotomia em dentes de cães, protegendo a polpa remanescente com *MTA*. Observaram que, após 60 dias havia presença de ponte de tecido mineralizado com estrutura tubular em dez das 13 raízes tratadas. Nos outros três dentes, os autores observaram problemas com o selamento coronário, presença de microrganismos, pontes delgadas e parciais. De modo semelhante, DUARTE, et al. (2003), avaliando a resposta de pré-molares de cães capeadas com Hidróxido de cálcio e *ProRoot® MTA* observaram formação de uma nova camada de células “odontoblastóides” abaixo da dentina em mineralização, caracterizando a formação de ponte sobre o tecido pulpar. Quando KOH et al. (2001) utilizaram o *MTA* como material capeador pulpar em dois pacientes, que apresentavam os segundos pré-molares inferiores com a anomalia dental “dens evaginatus”, observaram nos resultados histológicos, a deposição de uma ponte dentinária contínua, sob o *MTA* e ausência de inflamação pulpar.

Alguns autores observaram a formação de ponte de dentina com o uso do *MTA*, chegando também a compará-lo com o HC e verificando que os dois materiais apresentavam respostas semelhantes, quando em contato com o tecido pulpar. Entretanto estes resultados foram conflitantes com os apresentados em nosso estudo no que concerne ao tipo de estrutura mineralizada presente. Exemplo disto foi o trabalho de PITT FORD et al. (1996) que, utilizando *MTA* em capeamento pulpar de dentes de macacos demonstraram formação de ponte de dentina espessa e contínua com a dentina original em todas as polpas. Os autores ressaltaram ainda, a semelhança entre o *MTA* e o HC em relação ao aspecto histológico das pontes. De sua parte, MYERS et al. (1996) em seu estudo em dentes de cães, não encontraram diferenças significativas quanto ao estado pulpar e à formação de ponte, quando o *MTA* e o HC foram utilizados em capeamento pulpar. Também JUNN et al. (1998) realizaram um estudo, com o objetivo de quantificar a formação de dentina, quando o *MTA* e o HC foram usados, no capeamento pulpar em dentes de cães. Maior número de dentes com *MTA* demonstraram formação de dentina após duas semanas do tratamento. Já no grupo com HC a formação de dentina teve início após quatro semanas. Após oito semanas, havia maior proporção de pontes de dentina completas no grupo com *MTA*, do que no grupo com HC. AEINEHCHI et al. (2002) compararam cimento de HC e *MTA* no capeamento pulpar de terceiros molares de humanos. No geral, a avaliação histológica demonstrou ponte de dentina mais espessa e uma maior frequência da presença de uma camada odontoblástica, quando utilizaram o *MTA*.

No estudo de FARACO JUNIOR & HOLLAND (2001) os autores observaram a superioridade do *MTA* em relação ao Hidróxido de cálcio, quando utilizados no capeamento de polpas de cães expostas experimentalmente. No grupo

com Hidróxido de cálcio uma menor freqüência de formação de ponte de tecido mineralizado foi observada. Já no grupo com *MTA*, observou-se formação de ponte de tecido mineralizado em todos os casos. Para ambos os materiais, a ponte formada caracterizou-se por ser tubular, semelhante à dentina.

No presente estudo, o resultado histológico obtido com o HC demonstrou nos dois dentes tratados, a formação de uma ponte de tecido mineralizado, tipo osteóide evidenciando ainda infiltrado inflamatório moderado na polpa radicular. O tecido pulpar demonstrou também redução da camada de células “tipo odontoblastos”. Entretanto devido ao pequeno número de dentes utilizados para o HC apenas como controle positivo, não foi possível chegar a uma conclusão clara sobre a semelhança dos resultados com o *MTA*, apenas sugeri-la.

Como pôde ser verificado os resultados deste estudo não puderam ser comparados com os obtidos utilizando diferentes modelos animais, nem tampouco com os resultados obtidos após pulpotomia em dentes humanos. Diante dos achados histológicos deste trabalho, levanta-se a questão, quanto à diferença entre a capacidade de reparo do tecido pulpar nos diferentes modelos animais, tanto quanto ao tipo de tecido formado, como também com relação à velocidade de formação deste tecido. O gambá da espécie *Didelphis albiventris* nasce em período muito precoce de seu desenvolvimento embrionário. A gestação dura cerca de 12 dias e meio, sendo que nos nove primeiros dias formam-se os três folhetos embrionários e nos últimos três dias ocorre a maior parte de sua organogênese, essencial à sua sobrevivência. Desta forma, o metabolismo tecidual deste animal parece ser extremamente rápido, o que certamente influenciaria uma resposta mais acelerada dos seus tecidos a algum estímulo. Isto pode ter ocorrido com o tecido pulpar protegido com o *MTA* de ambas as marcas comerciais. Pode-se especular

que, a rápida velocidade da resposta reparadora pulpar explicaria o tipo de tecido formado, com aspecto osteóide, atubular, contendo em sua matriz, células dentro de lamelas (semelhantes a osteócitos) e grupamentos pulpares, que permaneceram aprisionados durante a rápida deposição e mineralização desta matriz.

Os resultados apresentados neste trabalho evidenciam a presença de infiltrado inflamatório leve no tecido pulpar, à semelhança de outros dados da literatura. PITT FORD et al. (1996) utilizando *MTA* em capeamento pulpar de dentes de macacos demonstraram inflamação em apenas uma amostra com *MTA*. JUNN et al. (1998) em seu estudo comparativo entre o *MTA* e o HC no capeamento pulpar em dentes de cães verificaram que os dentes com *MTA* mostravam ausência de inflamação, ao passo que no grupo do HC apenas uma pequena porcentagem dos dentes demonstrou estes resultados. Da mesma forma, FARACO JUNIOR & HOLLAND (2001) demonstraram a superioridade do *MTA* em relação ao Hidróxido de cálcio, quando utilizados no capeamento de polpas de cães expostas experimentalmente. No grupo com Hidróxido de cálcio observou-se, na análise histológica, maior frequência de inflamação. Já no grupo com *MTA*, observou-se ausência de inflamação em todos os casos. Também HOLLAND et al. (2001b) realizaram pulpotomia em dentes de cães, protegendo a polpa com *MTA*. Observaram que, após 60 dias havia ausência de inflamação em dez das 13 raízes tratadas, sendo que nos outros três dentes, devido ao problema com o selamento coronário, houve invasão microbiana e por isso os mesmos apresentavam um infiltrado inflamatório.

Utilizando o *MTA* como material capeador pulpar em dentes humanos KOH et al. (2001) observaram nos resultados histológicos, ausência de inflamação pulpar. Também AEINEHCHI et al. (2002) estudando a reação histológica em dentes

humanos, observou que o *MTA* e o cimento de HC se comportavam de modo diferente no tocante à inflamação, sendo esta menor nos dentes tratados com *MTA*.

Diante dos resultados obtidos, este trabalho pôde contribuir para demonstrar a biocompatibilidade das duas marcas comerciais do *MTA* como material protetor após pulpotomia em dentes de gambás, no período experimental de 60 dias. Verificou-se uma resposta pulpar semelhante tanto para o *MTA* Ângelus®, quanto para o *ProRoot*® apontando a possibilidade da utilização do produto nacional em novos estudos. Este fato é bastante promissor, pois o produto nacional é menos dispendioso e, portanto mais compatível com a Ótica social brasileira. Este trabalho também permitiu o início das experimentações utilizando o gambá da espécie *Didelphis albiventris* como modelo animal para testes de biocompatibilidade dos materiais odontológicos. A partir deste ponto, novos estudos são recomendados no sentido de:

- 1) esclarecer o real papel do *MTA* na resposta pulpar, através de análises histológicas histoquantitativas e imunocitoquímicas;
- 2) testar uma indução anestésica mais prolongada no animal, permitindo maior tempo de trabalho e atuação em maior número de dentes;
- 3) verificar a resposta do tecido pulpar do *Didelphis albiventris*, utilizando o *MTA* branco e o HC como grupos comparativos;
- 4) observar em diferentes intervalos de tempo: a organização do tecido pulpar; a resposta inflamatória promovida; a formação de ponte de tecido mineralizado, evidenciando sua espessura e consistência; e a presença de bactérias;
- 5) realizar outros estudos comparativos utilizando-se o *MTA* Ângelus.

7 CONCLUSÕES

- ✓ O gambá da espécie *Didelphis albiventris* mostrou-se como um modelo animal satisfatório para avaliação da biocompatibilidade dos materiais odontológicos utilizados na terapia pulpar conservadora.
- ✓ A reação histológica do tecido pulpar dos caninos do gambá *Didelphis albiventris*, observada por meio de microscopia de luz, na presença do MTA Ângelus® (Odontológica do Brasil) e ProRoot® MTA (Dentsply Tulsa Dental, Oklahoma-USA) foi semelhante, evidenciando a formação de uma ponte de tecido mineralizado “tipo osteóide”.
- ✓ A estrutura do tecido pulpar dos caninos do gambá *Didelphis albiventris*, observada por meio de microscopia de luz, na presença do MTA Ângelus® (Odontológica do Brasil) e ProRoot® MTA (Dentsply Tulsa Dental, Oklahoma-USA) foi semelhante, apresentando modificação na camada odontoblástica com diminuição do número de células e presença de infiltrado inflamatório leve.

8 SUMMARY

The purpose of this study was to evaluate the histological response of the pulps of canine teeth from *Didelphis albiventris* opossums to two commercial available Mineral Trioxide Aggregate (MTA): MTA Ângelus® and ProRoot® MTA (Dentsply Tulsa Dental, Oklahoma – USA). Five male, mid-sized opossums were captured at Estação Ecológica (UFMG) with IBAMA (Environment and Renewable Natural Resources Brazilian Institute) authorization. The study was approved by CETEA (Animal Experimentation Ethical Committee). Fourteen canine teeth were selected, and divided into four groups: group 1 - 5 upper left canines filled with Ângelus MTA® (Odontológica do Brasil); group 2 - 5 upper right canines filled with ProRoot® MTA (Dentsply Tulsa Dental, Oklahoma – USA); group 3 - 2 lower left canines used as a positive control; group 4 - 2 lower right canines used as a histological control that did not receive any treatment. After a 60 days observation period, the animals were killed by administration of an overdose of anaesthetic and the canines were processed for histological analysis. The specimens were embedded in paraffin and sectioned to an average thickness of 7 µm. The sections were stained with haematoxylin & eosin. After histological analysis, the results showed a similar pulp response for both experimental materials (MTA): a mineralized barrier consisting of a bone-like tissue was formed. Island formation that displayed considerable quantity of vital pulp tissue was observed. The cells in the pulp were normal, but showed a mild inflammatory process. This study showed that both samples of Mineral Trioxide Aggregate were able to induce pulp healing after pulpotomy in *D. albiventris* canines. The positive control group, with HC, showed the same histological response described for the two experimental groups but also a moderate inflammatory process was observed.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABEDI, H. R.; INGLE, J. I. Mineral trioxide aggregate: a review of a new cement. **J. Calif. Dent. Assoc.**, Loma Linda, v.23, n.12, p.36-39, Dec.1995.
2. ADAMO, H. L. et al., A comparison of MTA, Super-EBA, composite and amalgam as root-end filling materials using a bacterial microleakage model. **Int. Endod. J.**, New York, v.32, n.3, p.197-203, May.1999.
3. AEINEHCHI, M. et al. Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp capping agents in human teeth: a preliminary report. **Int. Endod. J.**, v.36, n.3. p.225-31, 2002.
4. AZEVEDO, N.; GOLDBERG, M. Le Développement Pos natal des Structures Dentaires Chez *Didelphis albiventris*. **Journal de Biologie Buccale**, v. 15, p. 23-35, 1986.
5. BERKOVITZ, B. K. B. The Homology of the Premolar Teeth in *Setonix brachiurus* (Macropodidae: Marsupialia). **Archives of Oral Biology**, v.11, p. 1371-1384, 1966.
6. BERNABÉ, P. F. E. et al. Evoluution of root end preparations an retrofelling materials in pulpless dog's teth (**J. Endod.**, 2002a) *apud* BERNABÉ, P. F. E. & HOLLAND, Roberto. *MTA e cimento Portland, considerações sobre as propriedades físicas, químicas e biológicas*. In: **Odontologia Arte e Conhecimento**. (1Ed.) São Paulo: Artes Médicas Ltda, v.1, cap.11, p.225-264, 2003.

7. BERNABÉ, P. F. E. et al. Healing process of root end treatment using ultrasonic instrument an MTA or Porthand ciment (**Int. Endod. J.**, 2002b) *apud* BERNABÉ, P. F. E. & HOLLAND, R. *MTA e cimento Portland, considerações sobre as propriedades físicas, químicas e biológicas*. In: **Odontologia Arte e Conhecimento**. (Ed) São Paulo: Artes Médicas Ltda, v.1, cap.11, p.225-264, 2003.
8. BERNABÉ, P. F. E.; HOLLAND, R. Cirurgia Paraendodontica: como praticá-la com embasamento científico. In: ESTRELA, C. **Ciência Endodontica**. São Paulo: Artes Médicas Ltda, v.2. c.16, p.657-797, 2004.
9. BERNABÉ, P. F. E.; HOLLAND, R. *MTA e cimento Portland, considerações sobre as propriedades físicas, químicas e biológicas*. In: **Odontologia Arte e Conhecimento**. São Paulo: Artes Médicas Ltda, v.1, cap.11, p.225-264, 2003.
10. BERNABÉ, P. F. E.; HOLLAND, R. O emprego do MTA na cirurgia paraendodôntica. (*Endonews*, v.2, p.2-5, 1999) *apud* BERNABÉ, P. F. E. & HOLLAND, Roberto. *MTA e cimento Portland, considerações sobre as propriedades físicas, químicas e biológicas*. In: **Odontologia Arte e Conhecimento**. Editora Artes Médicas Ltda - São Paulo, v.1, cap.11, p.225-264, 2003.
11. BLANCO, L. P. Treatmente of crown fractures with pulp exposure. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, v.82, n.5, p.564-568, 1996.
12. BLOCK, M. Wound healing in the newborn opossum (*Didelphis virginiana*). *Nature* 187, p.341, 1960 *apud* FELDMAN, D.B e ROSS, .P.W. Methods for obtaining neonates of known age from the virginia opossum. (*Didelphis*

- marsupialis virginiana*). **Laboratory Animal Science**, v. 25, n.4, p. 437-439, 1975.
13. BURKE, J. H. Reversal of external root resorption. **J. Endod.**, v.2, n.3, p.87-88, 1976.
 14. CAMP, J. H. Pulp therapy for primary and young permanent teeth. **Dent Clin North Am**, v.28, p.651-658, 1984.
 15. CAVALLERI, G.; ZERMAN, N. Traumatic crown fractures in permanent incisors with immature roots: a follow-up study. **Endod Dent Traumatol**, v.11, n.6, p.294-296, 1995.
 16. CLARK, C. T.; SMITH, K. K. Cranial Osteogenesis in *Monodelphis domestica* (Didelphidae) and *Macropus eugenii* (Macropododae) **Journal of Morphology**, v.215, p.119-149, 1993.
 17. COSTA, C. A. S. Teste de biocompatibilidade dos materiais odontológicos. In: ESTRELA C. Metodologia Científica. São Paulo: Editora Artes Médicas Ltda. c.10, p.161-194. 2001.
 18. COX, C. F. Biocompatibility of dental materials in the absesse of bacterial infection. **Oper. Dent.**, v.12, p.146-152, 1987.
 19. COX, C. F. et al. Capping of the dental pulp mechanically exposed to the oral microflora - a 5 week observation of wound healing in monkey. **J. Oral Pathol**, v.11, p.327-339, 1982.

20. COX, C. F. et al. Pulp capping of dental pulp mechanically exposed to oral microflora: a 1-2 year observation of wound healing in the monkey. **J. Oral Pathol.**, v.14, p.156-168, 1985.
21. COX, C. F. et al. Reparative dentin: factors affecting its deposition. **Quint. Int.**, v.23, p.257-270, 1992.
22. COX, C. F. et al. Tunnel defects in dentin bridges: their formation following direct pulp capping. **Operative Dentistry**, v.21, p.4-11, 1996.
23. COX, C. F.; SUZUKI, S. Re-evaluating pulp protection: calcium hydroxide liners vs. Cohesive hybridization. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.125, n.7, p.823-831, 1994.
24. CUTTS, J. H.; KRAUSE, W. J.; LEESON, C. R. General Observations on the Growth and Development of the Young Pouch Opossum, *Didelphis virginiana*. *Biology of the Neonate*, v.33, p. 264-272, 1978 *apud* KRAUSE, W.J., CUTTS, J.H. Scanning Electron Microscopic Observations of Developing Opossum Embryos: days 9 through 12. *Anatomischer Anzeiger*, v. 161, p.11-21, 1986.
25. CVEK, M. A Clinical report on partial pulpotomy and capping with calcium hydroxide in permanent incisors with complicated crown fractured. **J. Endod**, v.4, p.232-237, 1978.
26. DAHBERG, A. A. (ed). *Dental Morphology and Evolution*. Chicago: The University of Chicago Press, 350p., 1971. *apud* FONSECA, C. T. *Estudo histológico do desenvolvimento dentário do Didelphis albiventris (Lund, 1841) - Didelphidae - Marsupialia*. 1996. 101f. Dissertação (Mestrado em Morfologia) - Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, 1996.

27. DIAS, D.B. et al. Efeito de materiais à base de hidróxido de cálcio, em polpas de dentes de cães expostas experimentalmente. **Rev. Odont. UNESP**, v.17, n.1/2, p.27-42, 1988.
28. DUARTE, M. A. et al. PH and calcium release of 2 root-end filling materials. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, v.95, n.3, p.345-347, 2003.
29. DUARTE, P. C. T. et al. Análise histopatológica da resposta pulpar de dentes de cães pulpotomizados e capeados com MTA ou hidróxido de cálcio. *Pesq. Odontol. Bras.*, Anais da 20ª Reunião da SBPqO, Águas de Lindóia, SP., v. 17, supl. 2, p. 166, res. B-064, 2003.
30. EDA, S. Histochemical analysis on the mechanism of dentin formation in dog's pulp. **Bull. Tokyo Dent. Coll.**, v.2, n.2, p.59-88, Sept, 1961.
31. EISENBERG, J. F. *Mammals of the Neotropics. Vol. 1 Mammals of the northern of the Neotropics: Panama, Colombia, Venezuela, Guyana, Suriname, French Guyana*. Chicago: University of Chicago Press., 1989 *apud* MACHADO, C. T. Estudos histológico e ultra- estrutural do desenvolvimento pós - natal do baço do gambá *Didelphis albiventris* Lund, 1841 (Didelphidae: Didelphimorphia). 1999. 69f. Dissertação (Mestrado em Morfologia) - Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, 1999.
32. ESBÉRARD, C. E. O gambá, modelo experimental. **Ciência Hoje**, v.3, p.58, 1985.
33. ESTRELA, C. *Análise química de pastas de hidróxido de cálcio, frente à liberação de íons de cálcio, de íons hidroxila e ação do carbonato de cálcio na presença de tecido conjuntivo de cão*. (Tese de doutorado em Endodontia).

- São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – USP, 1994 *apud* ESTRELA, C.; HOLLAND, R. Hidróxido de cálcio. In **Ciência Endodôntica**. Editora Artes Médicas Ltda – São Paulo, v.2, cap.12, p.457-538, 2004.
34. ESTRELA, C. et al. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, sealapex and Dycal. **Braz. Dent. J.**, Brasil, v.11, n.1, p.3-9, Apr.2000.
35. ESTRELA, C. et al. Dentinal diffusion of hydroxyl ions of various of various calcium hydroxide paste. **Braz. Dent. J.**, v.6, n.1, p.5-9, 1995a.
36. ESTRELA, C. et al. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. **Braz. Dent. J.**, v.6, n.2, p.85-90, 1995b.
37. ESTRELA, C.; HOLLAND, R. Hidróxido de cálcio. In **Ciência Endodôntica**. Editora Artes Médicas Ltda – São Paulo, v.2, cap.12, p.457-538, 2004.
38. ESTRELA, C.; HOLLAND, R. Tratamento da polpa dentária inflamada. In **Ciência Endodôntica**. Editora Artes Médicas Ltda – São Paulo, v.1, cap.4, p.87-147, 2004.
39. FARACO Jr., I. M. *Histomorphologic evaluation of dog's dental pulp response capped with dentinal adhesive system, calcium hydroxide cement and two types of mineral trioxide aggregate*. Araçatuba, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, 1999. 251f. (Dissertação, Doutorado em Odontologia).

40. FARACO Jr., I. M.; HOLLAND, R. Response of the pulps of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. **Dent Traumatol**, v.17, n.4, p.63-66, 2001.
41. FELDMAN, D. B.; ROSS, P. W. Methods for obtaining neonates of known age from the virginia opossum. (*Didelphis marsupialis virginiana*). **Laboratory Animal Science**, v. 25, n.4, p. 437-439, 1975.
42. FONSECA, C. T. *Estudo histológico do desenvolvimento dentário do Didelphis albiventris (Lund, 1841) - Didelphidae - Marsupialia*. 1996. 101f. Dissertação (Mestrado em Morfologia) - Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, 1996.
43. FONSECA, G. A.; REDFORD, K. H.; PEREIRA, L. A. Notes on *Didelphis albiventris* (Lund, 1841) of Central Brazil. **Ciência e Cultura**, v.34, p.1358-1362, 1982.
44. FOSTER, K. H.; KULILD, J.C.; WELLER, R. N. Effect of smear layer removal on the diffusion of calcium hydroxide through radicular dentin. **J. Endod.**, v.19, n.3, March, 1993.
45. FUKS, A. B. et al. Partial pulpotomy as a treatment alternative for exposed pulps in crown - fractured permanent incisors. **Endod Dent Traumatol**, v.3, p.100-102, 1987.
46. FUKS, A. B.; BIELAK, S.; CHOSAK, A. Clinical and radiographic assessment of direct pulp capping and pulpotomy in young permanent teeth. **Pediatr Dent**, v.4, p.240-244, 1982.

47. FUSS, R. et al. Intracanal pH changes of calcium hydroxide pastes exposed to carbon dioxide in vitro. **J. Endod.**, v.22, n,4, p.362-364, 1996.
48. GLICKMAN, G. N.; KOCH, K. A. 21st-century endodontics. **J. Am. Dent. Assoc.**, Houston, v.131, Suppl:39S-46S, Jun.2000.
49. GODOI, F; VIEIRA, E. B. Avaliação do selamento coronário promovido por materiais restauradores temporários. 41f. Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.
50. GOLDBERG, F.; MASSONE, E. J.; SPIELBERG, C. Evaluation of the dentinal bridge after pulpotomy and calcium hydroxide dressing. **J. Endod.**, v.10, n.7, p.318-320, 1984.
51. GOMES, I. C. et al. Diffusion of calcium through dentin. **J. Endod.**, v.22, no.9, p.590-595, 1996.
52. HEIDE, S.; KEREKES, K. Delayed partial pulpotomy in permanent incisors of monkeys. **Int Endod J.**, v.19, p.78-89, 1986.
53. HEITHERSAY, G. S. Calcium hydroxide in treatment of pulpes teeth with associated pathology. **J. Brit. Endod. Soc.**, v.8, n.2, p. 74-93, 1975.
54. HEYS et al. Healing of primate dental pulps capped with teflon. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, v.69, n.2, p.227-237, 1990.
55. HIGASHI, T.; OKAMOTO, H. Characteristic and effects of calcified degenerative zones on the formation of hard tissue barriers in amputated canine dental pulp. **J. Endod.**, v.22, n.4, p.168-172, April, 1996.

56. HIRSCHFELD, Z. et al. Primary mineralization of dentin in rats after pulp capping with calcium - hydroxide. **Journal of Oral Pathology**, v.11, p.426-433, 1982.
57. HOLLAND, R. et al. Calcium hydroxide and corticosteroid antibiotic associations as dressing in cases of biopulpectomy. A comparative study in dog's teeth. **Braz Dent. J.** v.9, n.2, p.67-76, 1998.
58. HOLLAND, R. et al. Calcium salts deposition in rat connective tissue after the implantation of calcium hydroxide containing sealers. **J. Endod.**, v.28, n.3, p.173-176, March, 2002.
59. HOLLAND, R. et al. Effect of the dressing in root canal treatment with calcium hydroxide. **Rev. Fac. Odont. Araçatuba**, v.7, n.1, p.39-45, 1978.
60. HOLLAND, R. et al. Healing Process of Dog Dental Pulp after Pulpotomy and Pulp Covering with Mineral Trioxide Aggregate or Portland Cement. **Braz. Dent. J.**, v.12, n.2, p. 109-113, 2001b.
61. HOLLAND, R. et al. Healing Process of Dog's dental pulp after pulpotomy and Pulp Covering with calcium hydroxide in powder or paste form. **Acta Odontol. Pediat.**, v.2, n.2, p.47-51, 1981.
62. HOLLAND, R. et al. Histochemical analysis of the dog's dental pulp capping with calcium, barium, and strontium hydroxide. **J. Endod.**; v.8, n.10, p.444-7, Oct., 1982.
63. HOLLAND, R. et al. O Endogel no tratamento conservador da polpa dental. **Rev. Bras. Odontol.**, v.43, n.1, p.14-18, 1986.

64. HOLLAND, R. et al. Permeability of the hard tissue bridge formed after pulpotomy with calcium hydroxide: a histologic study. **JADA**, v.99, n.3, p.472-475, sept, 1979.
65. HOLLAND, R. et al. Reaction of dogs' teeth to root canal filling with mineral trioxide aggregate or a glass ionomer sealer. **J. Endod.**, São Paulo, v.25, n.11, p.728-730, Nov.1999b.
66. HOLLAND, R. et al. Reaction of human periapical tissue to pulp – extirpation a emmediate root canal filling with calcium hydroxide. **J. Endod.** v.3, n.2, p.63-67, 1977.
67. HOLLAND, R. et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with Mineral Trioxide Aggregate, Portland Cement or Calcium hydroxide. **Braz. Dent J.**, v.12, n. 1, p. 3-8, 2001a.
68. HOLLAND, R. et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with white Mineral Trioxide Aggregate. **Braz. Dent J.**, v.13, n.1, p.23-26, 2002.
69. HOLLAND, R. et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. **J. Endod.**, São Paulo, v.25, n.3, p.161-166, Mar.1999a.
70. HOLLAND, R. Histochemical response of amputated pulps to calcium hydroxide. **Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.**, v.4, n.1-2, p.83-95, 1971.
71. HOLLAND, R. Processo de reparo da polpa dental após pulpotomia e proteção com Hidróxido de cálcio. 1966 (Tese de Doutorado) Faculdade de Odontologia

- de Araçatuba. Universidade Estadual Paulista *apud* ESTRELA, C e HOLLAND, R. Hidróxido de cálcio. In: ESTRELA, C. Ciência Endodôntica. São Paulo: Artes Médicas, 2004, cap.12, p.457-538.
72. HOLLAND, R.; SOUZA, V. Clinical and biological considerations about endodontic therapy. I Conservative endodontic therapy. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, v.31, n.3, p.152-164, 1977.
73. JUNN, D. J. et al. Quantitative assessment of dentin bridge formation following pulp capping with Mineral trioxide aggregate (MTA). **J.Endod.**, v.24, n.4, p.278, 1998 (Abstract).
74. JURGERSKI, Jr. W. The Opossum (*D. virginiana Kerr*) as a Biomedical Model. **Laboratory Animal Science**, v.24, n.2, p. 376-425, 1974.
75. KAZEMI R. B; SAFAVI K. E.; SPANGBERG L. S. Assessment of marginal stability and permeability of an interim endodontic restorative material. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.6, n.78, p. 788-96.
76. KETTERING, J. D.; TORABINEJAD, M. Investigation of mutagenicity of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. **J. Endod.**, Loma Linda, v.21, n.11, p.537-539, Nov.1995.
77. KIRSCH, J. A. W. The classification of marsupials with special reference to karyotypes and serum proteins, in the Biology of Marsupials (ed. D. Hursaker), Academic Press, 1976, New York *apud* STONEHOUSE, B., GILMORE, D.(eds). **The Biology of Marsupials**. London: The Macmillian Press, 1977. 486p.

78. KLEIN, H. et al. Partial pulpotomy following complicated crown fractured in permanent incisors: A clinical and radiographical study. **J. Pedod**, v.9, p.142-147, 1985.
79. KOH, E. T. et al. Cellular response to mineral trioxide aggregate. **J. Endod.**, London, v.24, n.8, Aug.1998.
80. KOH, E. T. et al. Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. **J. Biomed. Mater. Res.**, London, v.37, n.3, p.432-439, Dec.1997.
81. KOH, E. T. et al. Prophylactic Treatment of Dens Evaginatus Using Mineral Trioxide Aggregate. **Journal of Endodontics**, v.27, n.8, p.540-542, 2001.
82. KOPEL, H. M. Considerations for the direct pulp capping procedure for primary teeth: A review of the literature. **J. Dent. Child.**, v.60, p.141-149, 1992.
83. KRAUSE, W. J.; CUTTS, J. H. Scanning Electron Microscopic Observayions of Developing Opossum Embryos: days 9 throught 12. **Anatomischer Anzeiger**, v.161, p.11-21, 1986.
84. LEE, S. J., MONSEF, M.; TORABINEJAD, M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. **J. Endod.**, Seoul, v.19, n.11, p.541-544, Nov.1993.
85. LITTICH, F. Uber Die Zahnentwicklung Bei Einem 6 cm Lagen Didelphysjungen, Gengenbaurs Morfologischers Jahrbuch, v.72, p. 303-308, 1933 *apud* FOSSE, G. Development of the Teeth in a Pouch- Young Specimen of *Antechinus stuartii* and a Puoch - Young Specimen of *Sminthopsis*

- crassicaudata*. Dasyuridae: Marsupialia. **Archives of Oral Biology**, v.14, p. 207-218, 1969.
86. MACHADO, C. T. *Estudos histológico e ultra- estrutural do desenvolvimento pós - natal do baço do gambá *Didelphis albiventris* Lund, 1841 (*Didelphidae: Didelphimorphia*)*. 1999. 69f. Dissertação (Mestrado em Morfologia) - Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, 1999.
87. MITCHELL, O. F.; SHANKAWALKER, G. B. Osteogenic potential of calcium hydroxide and other materials in soft tissue and bone wounds. **J. Dent. Res.**, v.37, p.1157-63, 1958.
88. MITCHELL, P. J. et al. Osteoblast biocompatibility of mineral trioxide aggregate. **Biomaterials**, London, v.20, n.2, p.167-173, Jan.1999.
89. MYERS, K. et al. The effects of mineral trioxide aggregate on the dog pulp. **J. Endod.**, v.22, n.4, p.198, 1996 (Abstracts).
90. NERWICH, A.; FIGDOR, D.; MESSER, H. H. pH changes in root dentine over a 4 week period following root canal dressing with calcium hydroxide. **J. Endod.**, v.19, n.6,p. 302-306, June, 1993.
91. NESSLINGER, C. L. Ossification Centers and skeletal Development in the Postnatal Virginia Opossum. **Journal of Mammalogy**, v.37, n.3, p. 382-394, 1956.
92. NOGUEIRA, J. C. Reprodução do gambá *Didelphis albiventres*. **Ciência e Cultura**, v.9, p.8-9, 1989.

93. OLIVEIRA, D. C.; LIA, R. C. C.; NETO, C. B. Efeito das pastas à base de hidróxido de cálcio sobre a polares de molares de ratos, exposta experimentalmente. Estudo histológico comparativo. **Rev. Odont. UNESP**, v.17, n.1/2, p.27-42, 1988.
94. OSORIO, R. M. et al. Cytotoxicity of endodontic materials. **J. Endod.**, v.24, n.2, p.91-96, Feb.1998.
95. PALMA, M. B. *Expressão de resíduos de açúcares durante a morfogênese dentária em gambás (Didelphis albiventris)*. 1997. 121f. Dissertação (Mestrado em Morfologia) - Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, 1997.
96. PEREIRA, J. C. et al. Effect of calcium hydroxide in powder or in paste form on pulp - capping procedures: histopathologic and radiographic analysis in dog's pulp. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, v.50, n.2, p.176-186, August, 1980.
97. PETRIDES, G. A. Sex and Age Determination of the Opossum. **Journal of Mammalogy**, v.30,n.4, p. 364-378, 1949.
98. PINTO, L. P.; SOUZA, L. B.; CARDOSO, L. B. Q. Resposta do tecido conjuntivo pulpar frente à proteção direta com hidróxido de cálcio P.A. e hidroxiapatita sintética. **RPG Rev. Pós. Grad.**, v.6, n.4, p.380-386, 1999.
99. PITT FORD, T. R. et al. Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. **J. Am. Dent. Assoc.**, London, v.127, n.10, p.1491-1494, Oct.1996.
100. PIVA, F. et al. Resposta pulpar de dentes de cães submetidos ao capeamento com Agregado de Trióxido Mineral branco. **Pesq. Odontol. Bras.**, Anais da 20ª

- Reunião da SBPqO, Águas de Lindóia, SP., v.17, supl.2, p.128, res. A167, 2003.
101. RAMOS, F. Os verdadeiros invasores somos nós - Pra saber mais. Disponível em <<http://www.setupwebsites.com.br/fre3.php>. Acesso em 11/01/2004.
102. REHMAN, K. et al. Calcium ion diffusion from calcium hydroxide-containing materials in endodontically treated teeth. An in vitro study. **Int. Endod. J.**, v.29, p.271-279, 1996.
103. REIS, M. L.; JUAREZ, F. M. Mastofauna. Disponível em <<http://www.semarnh.df.gov.br/site/cap05/06.htm>. Acesso em 11/01/2004.
104. RIGUEIRA, S. E., VALLE, C.M.C., VAREJÃO, J.B.M. et al. Algumas observações Sobre o Ciclo Reprodutivo Anual de Fêmeas do Gambá *Didelphis albiventris* (Lund, 1841) (Marsupialia, Didelphidae) em Populações Naturais no Estado de Minas Gerais, Brasil, **Revista Brasileira de Zoologia**, v.4, n.2, p. 129-137, 1987.
105. RUSSO, M. C.; HOLLAND, R.; SOUZA, V. Radiographic and histological evaluation of the treatment of inflamed dental pulps. **Int. Endod. J.**, v.15, n.3, p.137-142, 1982.
106. SAIDON, J. et al. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. **Oral surg Oral Med Oral Pathol.**, v.95, n.4, p.483-489, April, 2003.

107. SCHRÖDER, U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. **J. Dent.Res.**, v.64, p. 541-48, 1985.
108. SCHRÖDER, U. Evaluation of healing following experimental pulpotomy of intact human teeth and capping with calcium hydroxide. **Odont Revy**, v.23, p.329-340, 1972.
109. SCHWARTZ, R. S. et al. Mineral trioxide aggregate: a new material for endodontics. **J. Am. Dent. Assoc.**, Alaska, v.130, n.7, p.967-975, Jul.1999.
110. SEUX, D. M. L. et al. Odontoblast like cytodifferentiation of human pulp cells *in vitro* in the presence of a calcium hydroxide containing cement. **Archs. Oral Biol.**, v.36. n.2, p.117-128, 1991.
111. SILVA, F. T.; PUGLIESI, N. S.; ARAÚJO, V. C. Resposta do tecido conjuntivo pulpar frente ao hidróxido de cálcio P.A associado à água destilada e ao hidróxido de cálcio P.A. associado ao soro fisiológico. **RPG, Rev. Pós. Grad.**, v.3, n.1, p.59-65, 1996.
112. SILVA, G. A. B. *Capeamento pulpar direto com sistema adesivo dentinário: Estudo clínico e avaliação morfológica do complexo dentino-pulpar*. 2003. 261f. Tese (Doutorado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, 2003.
113. SLUYK, S. R., MOON, P. C., Hartwell, G.R. Evaluation of setting properties and retention characteristics of mineral trioxide aggregate when used as a furcation perforation repair material. **J. Endod.**, Virginia, v.24, n.11, p.768-771, Nov.1998.

114. SOARES, I. M. L. *Resposta pulpar ao MTA – Agregado de Trióxido Mineral – comparada ao hidróxido de cálcio em pulpotomias: histológico em dentes de cães. Florianópolis, 1996. 74p Tese (Professor Titular) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, apud BERNABÉ, P. F. E. & HOLLAND, R. MTA e cimento Portland, considerações sobre as propriedades físicas, químicas e biológicas. In: **Odontologia Arte e Conhecimento. Editora. Artes Médicas Ltda - São Paulo, v.1, cap.11, p.225-264, 2003.***
115. SOARES, M. S. M. et al. Proteção pulpar direta com hidróxido de cálcio e hidroxiapatita. Estudo histopatológico em polpas de dentes humanos. **RGO** (Porto Alegre), v. 43, n.3, p. 137-140, 1995.
116. SOUZA, E. M. D. *Desenvolvimento dentário em gambá *Dideplhis albiventris* (Marsupialia): Estudo Ultraestrutural, histoquímico e imunohistoquímico da Inervação Durante a Odontogênese do 1º Molar Superior. 1997. 201f. Tese (Doutorado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte.*
117. SOUZA, V. et al. Reaction of rat connective tissue to the implant of calcium hydroxide pastes. **Rev. Fac. Odontol. Araçatuba**, v.6, n.(1-2), p.69-79, 1977.
118. SOUZA, V.; HOLLAND, R. Treatment of inflamed dental pulp. **Austr. Dent J.**, v.19, p.191-196, 1974.
119. STANLEY, H. R. Criteria for standardizing and increasing credibility of direct pulp capping studies. **Am. J. Dent.**, v.11, p.17-34, 1998.

120. STONEHOUSE, B., GILMORE, D. (eds). The Biology of Marsupials. London: **The Macmillian Press**, 1977. 486p.
121. SÜBAY, R. K. et al. Human pulp response after partial pulpotomy with two calcium hydroxide products. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, v.80, n.3, p.330-337, September, 1995.
122. TEN CATE, A. R. Formação e destruição dos tecidos duros. In. TEN CATE, A. R. *Histologia Bucal: Desenvolvimento, Estrutura e função*. (5ª ED). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. c.5, p.68-75.
123. TORABINEJAD, M. et al. Antibacterial effects of some root end filling materials. **J. Endod.**, Loma Linda, v.21, n.8, p.403-406, Aug.1995d.
124. TORABINEJAD, M. et al. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. **J. Endod.**, Loma Linda, v.21, n.3, p.109-112, Mar.1995a.
125. TORABINEJAD, M. et al. Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. **J. Endod.**, Loma Linda, v.21, n.6, p.295-299, Jun.1995b.
126. TORABINEJAD, M. et al. Cytotoxicity of four root end filling materials. **J. Endod.**, Loma Linda, v.21, n.10, p.489-492, Oct.1995e.
127. TORABINEJAD, M. et al. Dye leakage of four root-end filling materials: effects of blood contamination. **J. Endod.**, Loma Linda, v.20, n.4, p.159-163, Apr.1994.

128. TORABINEJAD, M. et al. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. **J. Endod.**, Loma Linda, v.23, n.4, p.225-228, Apr.1997.
129. TORABINEJAD, M. et al. Investigation of mineral trioxide aggregate for root-end filling in dogs. **J. Endod.**, Loma Linda, v.21, n.12, p.603-608, Dec.1995g.
130. TORABINEJAD, M. et al. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. **J. Endod.**, Loma Linda, v.21, n.7, p.349-353, Jul.1995c.
131. TORABINEJAD, M. et al. Tissue reaction to implanted root-end filling materials in the tibia and mandible of Guinea pigs. **J. Endod.**, Loma Linda, v.24, n.7, p.468-471, Jul, 1998.
132. TORABINEJAD, M. et al. Tissue reaction to implanted super-EBA and mineral trioxide aggregate in the mandible of Guinea pigs: a preliminary report. **J. Endod.**, Loma Linda, v.21, n.11, p.569-571, Nov.1995f.
133. TORABINEJAD, M., CHIVIAN, N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. **J. Endod.**, Loma Linda, v.25, n.3, p.197-205, Mar.1999.
134. TORABINEJAD, M., WATSON, T. F., PITT FORD, T. R. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. **J. Endod.**, Loma Linda, v.19, n.12, p.591-595, Dec.1993.
135. TRONSTAD, L. et al. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. **J. Endod.**, v.7, n.1, p.17-21, Jan., 1981.
136. TYNDALE-BISCOE, C. H.; JANSSENS, P. A. Introduction. In: TYNDALAE-BISCOE e JANSSENS. **The Development Marsupial – Models for**

- Biomedical Research, Springer-Verlag, New York, p.1-7, 1988** *apud* FONSECA, C. T. *Estudo histológico do desenvolvimento dentário do Didelphis albiventris (Lund, 1841) - Didelphidae - Marsupialia*. 1996. 101f. Dissertação (Mestrado em Morfologia) - Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, 1996.
137. TZIAFAS, D. Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. **Int. J. Dev. Biol**, v. 39, p. 281-290, 1995.
138. TZIAFAS, D. et al. The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short - term capping experiments. **Int. Endod. J.**, v. 35, n.3, p. 245-54, 2002.
139. TZIAFAS, D. *The inductive ability of calcium hydroxide. In: Reparative dentinogenesis. The saloniki: University Studio Press, 1997, p.46-49 e 78-80* *apud* SCHUURS, A. H. B.; GRUYTHUYSEN, R. J. M.; WESSELINK, P. R. Pulp capping with adhesive resin-based composite vs. Calcium hydroxide: a review. **Endod. & Dent. Traumat.**, v. 16, p. 240-250, 2000.
140. TZIAFAS, D.; MOLYUDAS, I.; GREECE, T. The tissue reactions after capping of dog teeth with calcium hydroxide experimentally crammed into the pulp space. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, v.65, n.5, p.604-608, 1988.
141. TZIAFAS, D.; SMITH, A. J.; LESOT, H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. **J. Dent.**, v.28, p.77-92, 2000.
142. WAKABAYASHI, H. et al. Bio-microscopical observation os dystrophic calcification induced by calcium hydroxide. **Endod. Dent. Tarumatol.**, v.9, n.4, Aug., 1993.

143. WALKER, E. P. *Mammals of the world*, 3. ed. Baltimores: The John Hopkins University Press, v.1, 646p. 1975 apud PALMA, M. B. *Expressão de resíduos de açucares durante a morfogênese dentária em gambás *Didelphis albiventris**. Tese de Mestrado em Morfologia. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 121f, 1997.
144. WANG, J. D.; HUME, W. R. Difusion of hydrogen ion and hydroxill ion from various sources through dentine. **Int. Endod. J.**, v.21, n.1, p-17-26, Jan, 1988.
145. WUCHERPFENING, A. L.; GREEN, D. B. Mineral Trioxide vs Portland cement: two biocompatible filling materials. **J. Endod.**, v.25, n.4, p.308, 1999 (Abstract).

10 ANEXOS

- ✓ Licença para captura

- ✓ Certificado do CETEA