

ALFONSO GALA GARCÍA

**AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DO COMPÓSITO:
BIOCERÂMICA/ÁCIDO POLI (LÁTICO-CO-GLICÓLICO) EM
FIBROBLASTOS E MACRÓFAGOS E DA RESPOSTA PULPAR
APÓS CAPEAMENTO DIRETO.**

**BELO HORIZONTE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
2010**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE DO COMPÓSITO: BIOCERÂMICA/ÁCIDO POLI (LÁTICO-CO-GLICÓLICO) EM FIBROBLASTOS E MACRÓFAGOS E DA RESPOSTA PULPAR APÓS CAPEAMENTO DIRETO.

**Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em
Odontologia, nível Doutorado da Universidade Federal
de Minas Gerais, como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutor em Odontologia.**

Área de Concentração: Clínica Odontológica

Orientadora: Profa. Dra. Maria Esperanza Cortés

Co-orientador: Prof. Dr. Ruben Sinisterra Millán

BELO HORIZONTE

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

2010

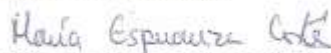
G146a Gala Garcia, Alfonso
2010 Avaliação da biocompatibilidade do compósito: biocerâmica/
T ácido Poli (Lático-Co-Glicólico) em fibroblastos e macrófagos a da
resposta pulpar após capeamento direto.
94f.: il.
Orientadora: Maria Esperanza Cortés
Co-orientador: Ruben Sinisterra Millán
Tese (Doutorado)- Universidade Federal de Minas Gerais.
Faculdade de Odontologia.
I. Resinas compostas - Teses. 2. Capeamento da polpa -
Teses. 3. Teste de materiais - Teses. I Cortés, Maria Esperanza.
II. Millán, Ruben Sinisterra. III. Universidade Federal de Minas
Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título

BLACK D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE DONTOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Tese intitulada "Avaliação da biocompatibilidade do compósito: biocerâmica/ácido poli (lático-co-glicólico) em fibroblastos e macrófagos e da resposta pulpar após capeamento direto", área de concentração em Clínica Odontológica, apresentada pelo candidato **Alfonso Gala Garcia**, para obtenção do grau de **Doutor em Odontologia**, **APROVADA** pela Comissão Examinadora constituída pelos seguintes professores:



Profa. Dra. Maria Esperanza Cortés
Orientadora – FO-UFMG



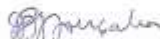
Profa. Dra. Márcia Martins Marques
FO-USP



Prof. Dr. Interlício Martelli Junior
UIMONTES



Profa. Dra. Célia Regina Moreira Lanza
FO-UFMG



Profa. Dra. Patrícia Valente Araújo Jacques Gonçalves
FO-UFMG



Prof. Dr. Saul Martins de Paiva
Coordenador do Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Belo Horizonte, 25 de maio de 2010.

Dios mío...

¡Te doy gracias por haberme cuidado todos estos años en el Brasil y por acompañarme espiritualmente en mi camino por el doctorado; haciendome aprender con mucha paciencia y cariño de esta inolvidable experiencia!

DEDICACIÓN ESPECIAL:

*Dedico la presente tesis doctoral a mis amados Padres:
Irma García Canales y Alfonso Gala Quispe, ejemplos de vida,
por su infinito amor y sabiduría mediante su gran enseñanza.
Muchas gracias por creer en mí y en mis objetivos incondicionalmente.*

DEDICO TAMBIÉN:

*A mis queridos hermanos **Gala-García** : Luz, Elva, César, Nidia, Coralí, Irma y Marlon por todo el cariño y la fuerza brindada siempre.*

A mis sobrinos: Lenci Abzalí, Irma Isabel, Francis Marcelo, Salvador Arol, Daliana Yael, Ítalo Rafael, Salim Leonardo y Dalí Fernando, a quienes yo amo mucho.

A mis cuñados y todos mis familiares por el gran cariño y toda la preocupación demostrada, en especial a Walter Giraldo.

*A mi bello y querido país la **Republica Del Perú**, el cual representa mi identidad y orgullo.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL:

À Profa. Dra. **María Esperanza Cortés**, orientadora deste trabalho, pela grande dedicação e por ter me dado as condições necessárias para a realização de esta pesquisa. Tenha certeza que todo seu valioso ensino ficará sempre presente na minha vida profissional.

AGRADECIMENTOS AOS PROFESSORES CO-AUTORES:

Ao Prof. Dr. Ruben Sinisterra, co-orientador deste trabalho, pelo incentivo científico, pela acolhida no Laboratório de Encapsulamento molecular e Biomateriais do Departamento de Química da UFMG e pelo trabalho em equipe.

À Profa. Dra. Leda Quercia Vieira do Departamento de Imunologia e Bioquímica do ICB-UFMG, que desde o mestrado me acolheu no seu laboratório com carinho e confiança. Sua colaboração científica é muito importante.

À Profa. Dra. Gerluza Borges Silva do Departamento de Biologia do Desenvolvimento do ICB-UFMG, pelo trabalho em equipe e pela valiosa colaboração científica neste trabalho.

À Profa. Dra. Márcia Martins Marques do Departamento de Dentística da Universidade de São Paulo, que mesmo sem me conhecer me acolheu no laboratório de cultura celular da FO-USP. Sua colaboração científica foi de grande valor neste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Colegiado de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia pela aceitação como aluno mediante o convênio internacional PEC-PG, em especial a Profa. Dra. **Isabela Almeida Pordeus**, pelo seu ensino e preocupação com a minha pessoa.

À Embaixada do Brasil no Peru que mediante o Programa Convênio Internacional de Estudantes de Pós-graduação PEC-PG, foram os responsáveis pela minha aceitação na FO-UFMG. Especialmente à senhora Carmem Castiella, responsável do setor cultural.

Aos professores da FO-UFMG: José Eustáquio da Costa, Maria Cássia Aguiar, Efigênia Ferreira, Miriam Vale, Vagner Santos, Alexandre Drummond, Antônio Paulino, Kátia Maltos, Tarcilia Silva, Luiz Thadeu Poletto e Saul Paiva pelo ensino e amizade.

De forma especial a Profa. Dra. Patrícia Zarzar, pela amizade sincera e por compartilhar sua experiência profissional, sua presença foi muito valiosa no desenvolvimento do doutorado.

Às Profas. Dras. Eliete Raso da FO-PUC e Célia Lanza da FO-UFMG, pelas considerações e valiosas sugestões feitas com tanta educação no exame de qualificação.

Às secretarias do Colegiado de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia Lais Santiso, Zuleica Rabelo e especialmente para Elizabeth Noronha pelo apoio e carinho.

A Mev Dominguez e Hellen Marra pela amizade e pela carinhosa acolhida em São Paulo.

Aos meus amigos Peruanos, Julio Bartra, Pedro Ponce, Juan Carlos Mestanza, Marisol Vivar, Alex Moncada e Lita Herrera, pela força sincera refletidas na grande amizade.

Especialmente para minha dentista e companheira de universidade Sandie Arévalo Cobos, pela amizade pura e sincera que cultivamos desde a graduação.

Aos mestrandos Patrícia Caldeira, Elizete Pereira, Thiago Compart, Giovanna Souto, Satoshi Takenaka, Telma Arão, Frederico Netto e Ivanna Diniz, pela preocupação e amizade.

Aos grandes amigos doutorandos André Pataro, Luis Otávio, Nelly Caires, Alessandra Neves, Carolina Martins, Soraya Grossman e Mariela Moura, que desde o mestrado começamos a aprender a pesquisar e que diariamente encontramos novos desafios.

Em especial para Thalita Santa Rosa, pela valiosa amizade e sabedoria, sua preocupação e carinho são de grande valor para mim. Obrigado pelas correções de português desta tese.

Ao Henrique Pretti, grande amigo de turma e companheiro da mesma área de concentração, juntos caminhamos pelo doutorado aprendendo e compartilhando grandes experiências.

Ao Marco Rosa, pela amizade e disponibilidade na análise estatística deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais Filipe Macedo, Sávio Morato e Patrícia Las Casas pela amizade e trabalho em equipe.

À Karina Teixeira pela importante contribuição científica no primeiro artigo.

Aos Pós-graduandos UFMG Renata Martins, Karina Bonanato, Daniela Goursand, Amanda Freitas, Érika Joviano, Isabel Freitas, Audrey Bueno, Aline Batista, Patrícia Valente, Ana Cecília Diniz, Fabiano Pereira, Jeane Correia, Ana Carolina Netto, Vanessa Bernardes, Fernanda Sardenberg, Claudia Viegas e Cristiane Bendo pelo aprendizado mútuo e amizade.

Ao Bruno Ferreira, Silvilene Martins e Conceição Moreira do Laboratório de Odontologia Restauradora da FO-UFMG pelo auxílio e carinho.

Aos colegas do laboratório de Imunologia e Gnotobiologia-ICB, Liliane, Daniel, Louisa, Juan, Paula, Magda e Marcelo pela força e amizade, em especial ao amigo Matheus Heitor.

Aos meus amigos Brasileiros Karina Barros, Sérgio Santos, Ildefonso Binatti, Leila Ferreira, Danilo Collado, Reinaldo Dos Santos e Romer Resende. Em especial para o Álamo De Oliveira, colega de apartamento, pela preocupação e longa amizade.

À Isadora Barcelos, amiga tenha certeza que sua amizade sincera, seu bom humor e seu valioso carinho são recíprocos, pode contar comigo sempre.

Ao Angelo Coimbra, valioso amigo e companheiro; agradeço pela força sincera e por fazer mais agradável e familiar minha estadia no Brasil.

Aos colegas de clube, Cristiano Duarte, Rafael Pais e Nonato Moura, que além das práticas esportivas nos finais de semana construímos uma sincera amizade e irmandade, em especial ao amigo Lúcio Tannure pela grande atenção demonstrada.

As agências Brasileiras de financiamento e apoio: CAPES, CNPq, FAPEMIG e INCT/Nanobiofar pelo apoio na realização do doutorado.

A Einco Biomateriais pela doação generosa dos biomateriais.

Aos animais, que com seu sacrifício contribuíram para o avanço do conhecimento e do bem estar humano.

A aqueles que de forma discreta e valiosa colaboraram com a realização deste doutorado.

Ao **Brasil**, país belo e hospitaleiro que através da FO-UFMG e do encanto dos **mineiros** me acolheram como mais um dos seus filhos.

RESUMO

Biocerâmicas associadas a polímeros para capeamento pulpar estão sendo investigadas pela capacidade de induzir a formação de tecido mineralizado. Esses materiais são usados na ortopedia e implantodontia com resultados clínicos eficientes. Contudo, pouco se sabe sobre seu efeito sobre a polpa dental e seus componentes celulares. O objetivo deste estudo foi avaliar a biocompatibilidade do compósito: biocerâmica de β -tricálcio fosfato/hidroxiapatita (BC) e copolímero ácido poli (lático-co-glicólico) (PLGA) (BC/PLGA), em cultura de fibroblastos da polpa dental humana (FP5) e de macrófagos peritoneais (MP), e avaliar a resposta pulpar após capeamento direto após 30 e 60 dias. A citotoxicidade foi avaliada através do ensaio MTT nos seguintes grupos: Controle (células), Compósito (BC/PLGA), BC e PLGA nos tempos de 0, 24 e 48h nos fibroblastos e 48h nos macrófagos. Ainda avaliou-se a aderência celular de fibroblastos gengivais humanos (FMM1) e MP sobre a superfície de discos de BC/PLGA. O resultado do ensaio MTT em FP5 foi analisado por ANOVA e Tukey. Houve crescimento celular progressivo dos FP5 em todos os grupos experimentais, semelhantes ao controle. Somente o grupo compósito apresentou diminuição da proliferação celular após 48 h em relação ao controle. Nos macrófagos não foi observado citotoxicidade em nenhum grupo ($p>0,05$). Excelente aderência celular dos FMM1 e dos MP foi observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) na superfície dos compósitos ($\geq 97\%$). Para a avaliação da resposta pulpar e formação de ponte dentinária após capeamento direto foram estabelecidos os seguintes grupos: BC/PLGA, BC, PLGA, hidróxido de cálcio e controle negativo após 30 e 60 dias. No Grupo BC/PLGA, a avaliação histológica do estado pulpar geral mostrou vitalidade e inflamação predominantemente leve a moderada tanto no grupo de 30 e 60 dias, não apresentando diferença significativa entre eles (Exato de Fisher $p>0,05$). Na avaliação da formação de ponte dentinária, após capeamento direto com BC/PLGA, houve formação de tecido mineralizado, observado a partir do 14º dia, sendo mais evidente no 30º dia em 90% das amostras. Entretanto, após 60 dias os resultados mostraram presença de ponte dentinária em 60% e houve diferença significativa com o grupo de 30 dias (Person Chi-Square $p<0,05$). Em conclusão, o compósito BC/PLGA não interfere na proliferação de fibroblastos humanos, foi biocompatível com os macrófagos, permite a aderência celular sobre os discos. O compósito BC/PLGA teve excelente desempenho no capeamento pulpar direto após 30 dias no modelo experimental utilizado, contudo, após 60 dias houve diminuição na porcentagem da presença de ponte dentinária, por tanto, sugere-se a necessidade de testá-lo em outros modelos experimentais, *in vivo*.

Palavras chave: Polímero, fibroblastos, macrófagos, ponte dentinária, capeamento pulpar.

The cell biocompatibility of a bioceramic/poly(lactic-co-glycolic acid) composite and its pulp response *in vivo* for pulp capping application.

Abstract:

The pulp capping with bioceramics, polymers and cements biomaterials able to trigger resident cells in the pulp to differentiate into odontoblast-like cells and to induce the formation of tertiary dentin is being investigated. The aim of the present study was to assess the cell viability of β -tricalcium phosphate-hydroxyapatite bioceramic (BC) and poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) composite (BC/PLGA) in peritoneal macrophages, human dental pulp fibroblasts (FP5) culture and to evaluate the rat dental pulp after direct capping pulp. The cell viability was evaluated using a MTT test in the following groups at 0, 24 and 48h for fibroblasts and 48h for macrophages. The result of cellular viability were statistically analyzed by ANOVA and supplemented by Tukey test ($p > 0.05$) for the 8 replicated for fibroblasts and 4 replicated for macrophages. There was progressive cell growth in all experimental groups in a similar form among the groups, although the composite presented a mild decreasing in cellularity counting been significantly lower than control after 48 h. The histological evaluation of inflammatory infiltrate and dentinal bridge formation after 60 d were carried after direct pulp capping in the groups: BC/PLGA composite; BC; PLGA and $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Scores were established for the hard tissue formation, general state of pulp and inflammatory response level. *In vivo* study showed that after 60 d BC/PLGA composite, BC or $\text{Ca}(\text{OH})_2$ groups had presence of dentinal bridge been that composite was the most prevalent (90%) reached the best scores when compare with the characteristic response of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ or when compare with the other groups. Mild to moderate inflammatory response was the most prevalent general state of the pulp after 30 days similar between composite (60%), or $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (65%). Moreover, necrosis was more prevalent after 60 days in both groups. The results obtained of reparative dentine bridge verified after pulp capping after 60 days with the experimental materials *in vivo* were possibly due to the chosen model. In conclusion, the BC/PLGA composite is biocompatible with human fibroblasts and peritoneal macrophages and direct pulp capping had the best tissue response when compare with $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

Keywords: Bioceramic, poly (lactic-co-glycolic acid), fibroblasts, macrophages, cellular viability, hard tissue bridge, dental pulp capping.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Preparação do compósito BC/PLGA (A) Materiais misturados nos tubos (B) Pastilhas cortadas.....30
- FIGURA 2.** Procedimento do ensaio MTT para os FP5 e MP: (A) Materiais; (B) Meio condicionado; (C) Plaqueamento das células e (D) Placa após aplicação dos reagentes.....34
- FIGURA 3.** Procedimento do ensaio de aderência celular das FMM1 e os MP sobre pastilhas de compósito BC/PLGA: (A) Pastilhas esterilizadas; (B) Distribuição das pastilhas na placa; (C) Plaqueamento das células sobre as pastilhas e (D) Placa após plaqueamento.....36
- FIGURA 4.** Capeamento pulpar direto no primeiro molar superior esquerdo do rato: (A) Animal anestesiado na mesa cirúrgica; (B) e (C) isolamento absoluto do primeiro molar superior esquerdo; (D) e (E) preparação da cavidade; (F) exposição; (G) colocação dos materiais e (H) restauração com amalgama de prata.....40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Distribuição do numero de dentes de ratos após 1, 7, 14 e 30 dias de capeamento pulpar. Estudo Preliminar. (Artigo 1).....	41
TABELA 2. Distribuição do numero de dentes de ratos após 30 e 60 dias de capeamento pulpar (Artigo 2).....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -TCP: α -Tricálcico Fosfato
ANOVA: Análise de Variância
 β -TCP: β -Tricálcico fosfato
BC: Biocerâmica
BC/PLGA: Compósito: Biocerâmica /Ácido Poli (Lático-co-Glicólico)
Ca: Cálcio
Ca (OH)₂: Hidróxido de cálcio
DMSO: Di-Metil-Sulfóxido
EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA: Enzime-Linked Immunoabsorbent Assay
FDA: *Food and Drug Administration*
FP5: Linhagem de Fibroblastos Pulpares Humanos
HA: Hidroxiapatita
Mesh: Unidade de Medida Granulométrica
MEC: Moléculas da Matriz Extracelular
MEV: Microscópio Eletrônico de Varredura
MTA: *Mineral Trioxide Aggregate*
MTT (Brometo de 3-(Dimetiltiazol-2-yl)2,5-Difeniltetrazólio)
MP: Macrófagos Peritoneais
mM: Massa Molar
Ng: Nanograma
IFN- γ : Interferon Gama
IL-4: Interleucina 4
P: Fósforo
PGA: Poli (Ácido Glicólico)
PLA: Poli (Ácido Lático)
PBS: Solução Tampão fosfato-salina sem cálcio e magnésio
PCL: Poli (C-caprolactona)
pH: Potencial hidrogeniônico
PLA:BC: Poli(ácido láctico)/ Biocerâmica
PLGA: Poli (Ácido Lático-co-Ácido Glicólico) ou Ácido Poli (Lático-co-Glicólico)
PRP: Plasma Rico em Plaquetas
SUS: Sistema Único de Saúde
SBF: Soro Fetal Bovino
TCP: Tricálcio Fosfato
TGF- β 1: Fator de Crescimento Transformante
 μ l: Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
	2.1 Polpa dental	19
	2.2 Capeamento pulpar direto.....	21
	2.3 Biocerâmicas.....	22
	2.4 Polímeros biorreabsorvíveis.....	24
	2.5 Compósito BC/PLGA	26
3	OBJETIVO GERAL	28
	3.1 Objetivos específicos	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
	4.1 Materiais	29
	4.2 Preparação do material	29
	4.2.1 Preparação das pastilhas e esterilização	29
	4.3 Avaliação da viabilidade celular frente ao compósito BC/PLGA <i>in vitro</i>	30
	4.3.1 Fibroblastos pulpares humanos (FP5)	30
	4.3.2 Macrófagos peritoneais (MP)	31
	4.4 Teste de viabilidade celular.....	32
	4.4.1 Grupos experimentais.....	33
	4.5 Avaliação da aderência celular ao compósito BC/PLGA.....	35
	4.5.1 Fibroblastos gengivais humanos (FMM1).....	35
	4.5.2 Macrófagos peritoneais (MP).....	35
	4.5.3 Ensaio da aderência celular para os FMM1 e MP.....	35
	4.6 Processamento da amostra para microscopia eletrônica de varredura (MEV)..	37
	4.7 Avaliação da resposta pulpar <i>in vivo</i>	37
	4.7.1 Cálculo amostral.....	38
	4.7.2 Procedimento de capeamento pulpar direto.....	38
	4.7.3 Aspectos éticos.....	42
	4.8 Processamento histológico para microscopia óptica (MO).....	42
	4.8.1 Critérios de avaliação.....	43
5	Referências bibliográficas.....	45
6	Artigo 1	53
7	Artigo 2	60
8	Perspectivas futuras.....	87
9	Produção bibliográfica.....	88
10	Anexos:.....	93
	10.1 Pareceres do Comitê de Ética UFMG.....	93

1. INTRODUÇÃO

O capeamento direto é um procedimento clínico que visa estimular o potencial dentinogênico do tecido pulpar, após trauma físico ou mecânico em um ambiente favorável para induzir à deposição de dentina no local exposto formando a ponte ou barreira dentinária (SCHROEDER, 1985). A formação de novo tecido dentinário em resposta a esses estímulos acontece se o ambiente for apropriado e livre de bactérias. O tecido duro neoformado é descrito como dentinóide, osteóide e como uma ponte reparativa da dentina.

O objetivo dos materiais usados para o capeamento pulpar direto é manter a vitalidade e função da polpa dentária, induzir a formação da ponte dentinária e para isso deve ter boas propriedades mecânicas e ser de simples manuseio. Atualmente, nenhum material foi considerado ideal, embora o hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) seja considerado o material de escolha apesar de provocar necrose superficial, ter baixa aderência e a qualidade da ponte dentinária formada ser deficiente. Nesse sentido, diversos materiais estão sendo pesquisados visando melhorar sua biocompatibilidade, oferecer condições para regeneração e evitar alterações dos tecidos duros e moles (CHRISTENSEN, 1998; OLSSON *et al.*, 2006).

O Ca(OH)_2 apresenta-se como agente terapêutico em função da sua capacidade de induzir a formação de tecido mineralizado e da ação antimicrobiana. As aplicações clínicas do Ca(OH)_2 na Odontologia incluem a medicação intracanal, tratamento de apexificação, reabsorções e perfurações radiculares assim como também em pulpotomias e capeamento pulpar (CHRISTENSEN, 1998; FARHAD & MOHAMMADI, 2005; OLSSON *et al.*, 2006). As propriedades do Ca(OH)_2 derivam de sua dissociação iônica em íons cálcio e íons hidroxila, sendo que a ação desses íons sobre os tecidos e as bactérias explica suas propriedades biológicas e antimicrobianas (JOE, 2008; ESTRELA & PESCE, 1996; ESTRELA & PESCE, 1997). A participação dos íons cálcio nos processos de mineralização foi demonstrada pela ativação de enzimas como a pirofosfatase ou a fosfatase alcalina; em consequência, há formação de ponte dentinária, selamento biológico apical e oclusão dos túbulos dentinários (DESAI & CHANDLER *et al.*, 2009; KARDOS *et al.*, 1998; HØRSTED-BINDSLEV *et al.*, 2003). Pameijer & Stanley (1998) demonstraram que o efeito cáustico do Ca(OH)_2 não gera dano permanente ao tecido pulpar e a irritação superficial está envolvida na diferenciação de células pulpares saudáveis em células “tipo odontoblastos” (SCHUURS *et*

al., 2000). Contudo este material, ainda não é considerado ideal para capeamento pulpar por proporcionar pobre aderência à dentina, ser inábil em fornecer selamento em longo prazo (o que pode gerar micro infiltração) e pela ponte dentinária produzida apresentar porosidade. Outros estudos afirmam que o Ca(OH)_2 pode criar mudanças degenerativas tais como a inflamação persistente e a calcificação distrófica no tecido restante da polpa (SCHROEDER, 1985).

Diversas substâncias alternativas ao Ca(OH)_2 têm sido propostas para capeamento pulpar direto, dentre elas, o agregado de trióxido mineral (MTA), a hidroxiapatita, cerâmicas de fosfato de cálcio, matriz derivada do esmalte (EMD), ácido hialurônico, fatores de crescimento, proteínas osteogênicas, fatores de crescimento, adesivos dentinários e novos cimentos endodônticos (TORABINEJAD & CHIVIAN, 1999; FARACO & HOLLAND, 2004; HAYASHI *et al.*, 1999, HIGASHI & OKAMOTO, 1996; ISHIZAKI *et al.*, 2003, SASAKI & KAWAMATA-KIDO, 1995; JEPSEN *et al.*, 1997; HU *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2006; ASGARY *et al.*, 2009). Porém, os resultados ainda não são totalmente favoráveis em função de qualidade da ponte dentinária e biocompatibilidade do material.

As biocerâmicas (BC) têm apresentado utilidade em reconstruções de grandes perdas ósseas faciais e ortopédicas, inclusive no tratamento de osteomielites, mostrando condições satisfatórias em relação à resistência mecânica e módulo de elasticidade do tecido ósseo neoformado em função da osteocondução e osteoindução que elas favorecem e reposição óssea. O uso das BC está direcionado para o reparo fisiológico dos componentes celulares contribuindo para a melhoria da qualidade do osso neoformado (HENCH, 2000). A BC associada a polímeros biodegradáveis foi pesquisada como material para ortopedia e recentes estudos realizados com estes biomateriais têm apontado seu enorme potencial para o uso em defeitos ósseos, promovendo a osteogênese ou neoformação de osso e facilitando sua reposição (RUHÉ *et al.*, 2006). A reposição óssea é uma função ativada por macrófagos, a partir dos tecidos ósseos adjacentes pela rápida absorção do β -Tricalcio fosfato (β -TCP) com o suporte inerte de HA densa (HASHIMOTO-UOSHIMA *et al.*, 1995). Recentemente estudos associam biomateriais como fosfatos de cálcio com o polímero ácido poli (lático-co-glicólico) (PLGA) no capeamento pulpar direto para induzir neoformação de tecido mineralizado e consequente ponte dentinária com resultados promissores (ZHANG *et al.*, 2008).

Os compósitos obtidos a partir de biocerâmicas e polímeros melhoraram as propriedades físicas dos dois materiais isoladamente, especialmente pelas características

termoplásticas do polímero, diminuindo a fragilidade da cerâmica e permitindo sua utilização na prática clínica (PATARO *et al.*, 2007). No entanto, pouco se sabe do efeito do compósito biocerâmica/ ácido poli (lático-co-glicólico) (BC/PLGA) sobre a polpa dentária humana e sobre os seus componentes celulares. Nesse sentido se faz necessário o estudo desses materiais em cultura de células, *in vitro*.

O conhecimento do comportamento dos biomateriais frente às células é importante para elucidar seu efeito na viabilidade, proliferação, aderência celular, diferenciação até atividades celulares específicas. Dessa maneira, é possível antecipar os efeitos citotóxicos e/ou benéficos dos materiais na polpa dental antes destes serem testados *in vivo*. (HUANG & CHANG, 2002; HANKS *et al.*, 1996; VAN WYK *et al.*, 2001). Dentre os diversos componentes celulares da polpa dental, nos quais se destacam odontoblastos, fibroblastos, células mesenquimais indiferenciadas, macrófagos e outras células imunocompetentes, bem como vasos sanguíneos, linfáticos, fibras nervosas e, permeando esse conjunto, substância fundamental amorfa. Na polpa dental os fibroblastos e os macrófagos são as células mais numerosas e ambas participam no processo de resolução da inflamação pulpar. O presente trabalho propõe avaliar o efeito de um compósito formado por biocerâmica e um polímero biodegradável BC/PLGA na viabilidade e aderência dessas células. Ainda, baseados em estudos prévios que mostraram a formação de ponte dentinária e a baixa resposta inflamatória, serão estudada a resposta *in vivo* desse compósito no capeamento pulpar direto em polpa dentária de ratos após 30 e 60 dias, sob a hipótese de que o compósito possibilite a formação de ponte dentinária com propriedades superiores a aquela formada pelo hidróxido de cálcio e dessa forma permitindo sua utilização na prática odontológica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Polpa dental

A polpa dental é constituída por um tecido conjuntivo frouxo o qual, junto com a dentina, forma o complexo dentino-pulpar. A polpa contribui para a formação da dentina, além de várias funções secundárias relacionadas à sensibilidade dentária, hidratação e defesa. Atualmente está bem estabelecido que a polpa dentária normal é constituída por populações celulares heterogêneas, nas quais células tipo fibroblastos encontram-se em maior concentração. Também se encontram células inflamatórias e células do sistema imune (macrófagos, células dendríticas, histiócitos e linfócitos-T), e células-tronco em estado de latência envolvidas principalmente na sua autorrenovação. Em casos de injúria ao complexo dentino-pulpar, as células-tronco podem intervir na reparação, pois elas apresentam a capacidade de se diferenciar em diferentes tipos celulares (MJOR *et al.*, 2001) e até na mineralização. A polpa contém também nervos (axônios e células de Schwann), células vasculares e perivasculares (células endoteliais, células musculares lisas vasculares, células reguladoras do fluxo sanguíneo, células de Rouget ou pericito) (GOLDBERG & SMITH, 2004; GOLDBERG *et al.*, 2008).

No dente adulto saudável encontram-se os odontoblastos e as células da camada subodontoblástica, constituindo uma fina fronteira situada entre a margem interna da dentina e o limite exterior da polpa. Essas células pós-mitóticas polarizadas são responsáveis pela produção de dentina primária, secundária e fisiológica, juntamente com as moléculas de cálcio. Dessa maneira ocorre um progressivo espessamento da dentina segundo a idade da polpa dental. Os fibroblastos pulpares são as células mais numerosas e estão distribuídos em toda a polpa, sendo mais abundantes na zona rica em células e apresentam aspecto fusiforme com núcleo central e ovóide. Seus longos prolongamentos e citoplasma com típicas organelas de síntese e secreção refletem sua capacidade de renovação e produção dos elementos da matriz extracelular. Eles têm a função de produzir fibras colágenas na polpa dental, degradar e renovar seu colágeno e também apresentam a particularidade de se manter quase sempre numa modalidade relativamente indiferenciada (GRONTHOS *et al.*, 2002). A literatura mostra que os fibroblastos pulpares têm a capacidade ou potencial de se diferenciar em células tipo odontoblastos mediante um estímulo externo ou interno em algumas condições

experimentais, contribuindo na formação de nódulos mineralizados (STANISLAWSKI *et al.*, 1997).

Os macrófagos são células do sistema mononuclear fagocitário que possuem notável heterogeneidade, resultante de sua diferenciação celular, distribuição tecidual e resposta a estímulos endógenos e exógenos (GORDON & TAYLOR, 2005; STRAUSS-AYALI *et al.*, 2007). Os macrófagos pulpares constituem junto com as células dendríticas cerca de 8% do total de células na polpa e estão associados com a remoção de células mortas. Eles exercem três funções principais: fagocitose, formação de antígenos e imunomodulação através da produção de várias citocinas e fatores de crescimento. Durante o processo inflamatório pulpar e processos periapicais, os macrófagos são as células defensivas mais prevalentes na polpa em associação com os linfócitos e plasma (ORSTAVIK & MJOR, 1992).

Os mecanismos de ação da inflamação e cicatrização da polpa têm sido subestimados e muitas vezes considerados apenas um efeito indesejável, devido ao fato de ocorrer necrose pulpar na maioria dos casos. Em razão disso, o processo inflamatório deve ser reexaminado para compreender melhor seu potencial e o seu efeito benéfico abrindo caminho para melhor compreensão dos eventos moleculares iniciais e celulares que levarão à reparação da polpa, e em consequência ao desenvolvimento de materiais ideais para promover a cicatrização pulpar (GOLDBERG *et al.*, 2008).

Para o permanente desenvolvimento de novos biomateriais de uso odontológico é necessário que sejam conduzidos estudos preliminares em cultura de células, *in vitro*; com a finalidade de caracterizar potenciais efeitos prejudiciais do material nos tecidos, antes que o material seja testado e usado clinicamente (SCHMALZ, 1997; ISO, 1999). A seguir, se o material testado não for citotóxico, poderia ser implantado subcutaneamente e posteriormente, avaliam-se os efeitos *in vivo* sobre células e tecidos específicos, utilizando modelos animais ou humanos (ISO, 1994; SCHMALZ, 1997).

O uso de cultura celular foi desenvolvido para avaliar a biocompatibilidade de novos materiais implantados no corpo, simulando reações biológicas, e dessa forma determinar seus efeitos citotóxicos, assim na odontologia são avaliados os efeitos dos materiais restauradores sobre a polpa dental (HUANG & CHANG, 2002). Assim, as pesquisas estão sendo orientadas para o desenvolvimento dos materiais que permitam ou promovam a função e a diferenciação dos tecidos associados com os materiais (HANKS *et al.*, 1996; VAN WYK *et al.* 2001).

Os materiais utilizados para capeamento pulpar devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos hospedeiros, de modo a estimular uma resposta adequada dos mesmos. Segundo a Federação Dentária Internacional (1980) testes *in vitro* realizados em modelo de cultivo celular são classificados como testes iniciais com o intuito de se avaliar a citotoxicidade de materiais. Para este tipo de análise, tipos celulares diferentes podem ser utilizados, sendo usualmente testadas as células primárias porque possuem potencial metabólico específico mais próximo das condições *in vivo*. Assim, na Odontologia foram realizados estudos *in vitro* utilizando o modelo de cultura de células para avaliar a citotoxicidade dos materiais dentários. (SCHMALZ, 1997; PIZZOFERRATO *et al.*, 1994; POLYZOIS, 1994).

Além da avaliação da citotoxicidade, outro aspecto importante é a aderência celular, envolvida em várias funções naturais tais como a embriogênese, a manutenção da estrutura tecidual, cicatrização, resposta imune e integração dos tecidos nos biomateriais (YAMADA & GEIGER, 1997; DILLOW & TIRREL, 1998). Nesse sentido, o papel da adesão celular nesse ambiente é garantir o sucesso dos biomateriais biológicos ou sintéticos implantados. No caso específico dos fibroblastos, a aderência celular à superfície do biomaterial é um pré-requisito para a formação de um novo colágeno (DILLOW & TIRREL, 1998) e os macrófagos (KAIDA *et al.*, 2008) farão parte do processo de reparação tecidual.

2.2 Capeamento pulpar direto

O capeamento pulpar direto é um procedimento clínico que consiste em colocar um material no local onde houve uma exposição pulpar com o objetivo de preservar ou proteger os tecidos do complexo dentino-pulpar e as células que o compõem e assim, induzir à regeneração e manter sua vitalidade. Este procedimento é indicado para ferimento da polpa após trauma físico ou mecânico, e condições ideais quanto à idade, assepsia, saúde do paciente, tamanho da exposição, pouca hemorragia e boa resposta ao estímulo favorecem o sucesso da terapia (CHRISTENSEN, 1998).

Nesse tratamento, objetiva-se estimular a deposição de tecido mineralizado no local (HØRSTED-BINDSLEV *et al.*, 2003; STOCKTON, 1999), promovendo o potencial dentinogênico das células do complexo dentino-pulpar (SCHRÖEDER, 1985), evitando a evolução do processo de injúria, o qual poderia culminar no tratamento endodôntico radical ou

a exodontia. A remoção da irritação, o controle da infecção, e a biocompatibilidade do material para capeamento direto são fatores importantes no sucesso do tratamento. Estudos mostram a potencialidade da cicatrização da polpa, em um ambiente apropriado para a formação da ponte dentinária em estudos de polpas mecanicamente expostas em um ambiente livre de microorganismos (*germ-free*) quando comparados com os que não receberam material capeador (KAKEHASHI *et al.*, 1965).

As revisões sistemáticas, em relação à formação de ponte dentinária após capeamento pulpar direto não relatam evidências suficientes sobre os estudos. Contudo, o capeamento pulpar é uma técnica válida que deve ser utilizada para a conservação do tecido pulpar e a formação de dentina reparadora (OLSSON *et al.*, 2006).

2.3 Biocerâmicas

As biocerâmicas (BC) à base de fosfato de cálcio são usadas para substituição óssea. Elas têm diferentes tipos de apresentação como grãos, blocos, compósitos, cimentos ou revestimentos em implantes ortopédicos e odontológicos. As BC podem ser usadas como andaimes na engenharia de tecidos para regeneração óssea ou dentinária (EL-GHANNAM, 2005). Os fosfatos de cálcio são similares à composição do osso e têm a propriedade de osteocondução e bioatividade. A osteocondução funciona como guia para o osso recém formando e a bioatividade é a ligação diretamente ao osso formando uma única interface forte promovendo a formação de uma camada de carbonato de hidroxapatita, que atrai as proteínas que ligam as células, proliferando e diferenciando-se e formando novo osso (biomineralização). Os poros presentes na biocerâmica podem ser obtidos por métodos físicos ou químicos; eles interligam os macro e microporos semelhante ao tecido ósseo favorecendo à osseointegração (LEGEROS *et al.*, 2003; LEGEROS, 2008).

Materiais cerâmicos usados com finalidade biológica são chamados biocerâmicas e podem ser classificados de acordo com sua capacidade de estimular neoformação óssea:

1. Bioinertes: como a alumina e zircônia.
2. Bioativos: Com superfície bioativa, como a hidroxapatita sintetizada Bioglass[®] possuem a capacidade de induzir a neoformação tecidual.

3. Biorreabsorvíveis: Hidroxiapatita não calcinada e não sintetizada, α e β -Tricálcio fosfato (α -TCP e β -TCP), tetracálcico fosfato, octacálcico fosfato, etc. (SHIKINAMI & OKUNO, 1999).

Dentre os materiais que têm sido utilizados para reconstituição óssea, as biocerâmicas e os biovidros de fosfato de cálcio são predominantemente utilizados, eles são similares apesar das diferenças na sua composição e nas diferentes maneiras de sua preparação. *In vivo*, a biocerâmica de fosfato mostrou excelente biocompatibilidade, a estrutura micro-macro porosa, bifásica, ou seja, uma fase mais estável hidroxiapatita (HA) e outra mais solúvel tricálcio fosfato (TCP), apresentam melhores resultados como materiais de preenchimento ósseo (LIN *et al.*, 1998). Os fosfatos de cálcio podem ser usados também como suporte na engenharia de tecidos para regeneração óssea ou dentinária, em razão da sua semelhança na composição e com seus bioativos forma uma única interface forte. Sua propriedade bioativa promove a formação de uma camada de carbonato de hidroxiapatita, que atrai proteínas aderindo células, e conseqüentemente a proliferação e diferenciação da matriz, resultando na biomineralização (osteoindutora) interessante para os fins médicos e odontológicos (LEGEROS, 2008; LEGEROS, 1988).

Diversos estudos mostram que a associação das características de rápida absorção do β -TCP com o suporte inerte de HA densa propiciou uma ativa reposição óssea, ativada por macrófagos, a partir dos tecidos ósseos adjacentes (HASHIMOTO-UOSHIMA *et al.*, 1995).

Os trabalhos de Wykrota *et al.*, (1998) e Wykrota *et al.*, (1999) em um estudo longitudinal de 14 anos utilizando a biocerâmica Osteosynt[®] para reconstruções de grandes perdas ósseas faciais e ortopédicas, inclusive no tratamento de osteomielites, mostraram condições satisfatórias em relação à resistência mecânica e o módulo de elasticidade do tecido ósseo neoformado.

As biocerâmicas de última geração, bifásicas micro-macro porosas, são compostas por 35% de β -TCP, fase mais solúvel das biocerâmicas, e 65% de HA, fase menos solúvel das biocerâmicas de primeira geração de HA. Esse biomaterial apresenta macro-poros intercomunicantes, na faixa de 50-400 μm , que induzem uma resposta orgânica mais efetiva, forte ligação e crescimento tecidual intrínseco. Também apresenta micro-poros intercomunicantes, inclusive com os macro-poros, na faixa de 1 μm e 10 μm que aumentam o contato tecidual, a solubilidade e a capacidade de trocas com os líquidos orgânicos, além de

poros intermediários de 10 μm a 50 μm . Essa estrutura arquitetônica porosa está indicada como um eficaz e importante veículo condutor e liberador de fármacos ou outras substâncias por um período determinado, assim como sua topografia superficial permite atividade metabólica osteoblástica e expressão desejável dos fenótipos de neoformação tecidual (WYKROTA *et al.*, 1998). No estudo de Lobo *et al.*, (2009), foi demonstrada a superior osteoindução intrínseca da biocerâmica Osteosynt[®], quando usada na forma granular para preenchimento de defeitos ósseos de 5 mm de diâmetro em fêmures de coelhos *New Zeland*, comparado-os com os grupos sem preenchimento, com plasma rico em plaquetas (PRP) ou com biocerâmica associada ao PRP.

O uso de materiais cerâmicos têm influência na resposta da polpa dental, como relatado no estudo de Higashi & Okamoto (1996). O tamanho das partículas de β -trifosfato de cálcio e hidroxiapatita de 300 μm influenciaram na formação de tecido mineralizado em até 64% das polpas, estatisticamente significativo quando comparado com o grupo capeado com β -trifosfato de cálcio e hidroxiapatita de 40 μm tamanho.

2.4 Polímeros biorreabsorvíveis

O uso de polímeros biorreabsorvíveis como suporte nos biomateriais para testes *in vitro* ou *in vivo* vem tendo destaque na engenharia de tecidos (YU *et al.*, 2010). Os polímeros biorreabsorvíveis são materiais e dispositivos sólidos que mostram degradação através da diminuição de tamanho e que são reabsorvidos *in vivo*, ou seja, materiais que são eliminados pelas rotas metabólicas do organismo. Biorreabsorção é um conceito que reflete a eliminação total do material e dos subprodutos de degradação (compostos de baixa massa molar) sem efeitos colaterais residuais. O uso da palavra "biorreabsorção" é utilizado quando a eliminação é total. Os polímeros bioabsorvíveis são materiais que podem ser dissolvidos nos fluidos corpóreos sem qualquer clivagem da cadeia macromolecular ou diminuição da massa molecular. Por exemplo, este é o caso da lenta dissolução de implantes solúveis nos fluidos orgânicos. Um polímero pode ser bioreabsorvível se suas macromoléculas são excretadas. O termo biodegradável é utilizado para polímeros e dispositivos sólidos que devido à degradação macromolecular sofrem dispersão *in vivo*, mas sem a eliminação dos produtos e subprodutos pelo organismo. Os polímeros biodegradáveis podem ser atacados por elementos biológicos de forma que a integridade do sistema seja afetada, formando-se fragmentos ou outros

subprodutos de degradação, que podem ser removidos do seu local de ação, mas não necessariamente do organismo (VERT *et al.*, 1992; LI, 1999; YU *et al.*, 2010).

Dentre os polímeros sintéticos biodegradáveis e biorreabsorvíveis encontram-se os poli (α -hidróxiácidos), representantes de uma classe de poliésteres alifáticos sintéticos, dos quais fazem parte o poli (ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), seus copolímeros e outros, originalmente usados como fios de sutura (Dexon[®], Vicryl[®], Maxon[®], PDS[®], etc). Atualmente os poli (α -hidróxiácidos) podem ser encontrados em diversos produtos comerciais de fixação óssea, tais como Biofix[®], FixSorb[®], Neofix[®], ResorPin[®], etc, aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA). As aplicações dos polímeros biodegradáveis são muito amplas e vão desde o uso em sistemas de liberação controlada de fármacos até a aplicação na engenharia de tecidos (KUMARI *et al.*, 2010). O processo de biodegradação e biorreabsorção dos poli (α -hidróxiácidos) descrito na literatura ocorre em uma sucessão de eventos. Quando expostos aos fluidos aquosos do corpo, inicialmente o material sofre hidratação. Com a presença das moléculas de água, o processo de degradação dá-se através da hidrólise das ligações ésteres, originando produtos na forma de oligômeros (ou monômeros) solúveis e não tóxicos. A degradação prossegue por um processo biologicamente ativo mediado por enzimas ou pela clivagem hidrolítica passiva. Tal mecanismo é caracterizado pela perda de massa, diminuição de massa molar ponderal média (mM) e pela perda das suas propriedades mecânicas, como a resistência à tração e à compressão (HUANG *et al.*, 2004).

O mecanismo da degradação *in vitro* dos polímeros bioreabsorvíveis tem sido avaliado nos últimos anos e demonstra ser um processo heterogêneo na extensão do material. Dentre os produtos da hidrólise das ligações ésteres como oligômeros e monômeros, e a presença de terminais ácidos catalisa a reação de degradação. É o chamado efeito autocatalítico dos poli (α -hidróxiácidos). O processo é homogêneo inicialmente, gerando oligômeros solúveis em água em toda a extensão do material, os produtos presentes na superfície da matriz são difundidos para o meio. Entretanto, a baixa taxa de difusão dos produtos da reação no interior do material gera um acúmulo de ácidos, fazendo com que estruturas densas tenham uma erosão inicial na superfície, mas apresentando uma degradação mais acentuada na parte central (LI, 1999; YU *et al.*, 2010).

2.5 Compósito BC/PLGA

A incorporação de biocerâmica em dispositivos poliméricos oferece uma estrutura mineral que disponibiliza Cálcio (Ca) e Fósforo (P) para a neoformação de tecido ósseo, além de neutralizar os subprodutos ácidos da degradação polimérica. A hidroxiapatita, quando presente na estrutura do compósito apresenta características osteocondutoras (CIAPETTI *et al.*, 2003).

Pataro *et al.* (2007) avaliaram a biocompatibilidade de polímeros (PLGA ou PLA) dispersos em uma matriz biocerâmica (Osteosynt®) com adição de um fármaco, tetraciclina, mediante ensaios de contato direto e indireto, *in vitro*, e testes de resposta inflamatória, *in vivo*, após implante subcutâneo dos compósitos em camundongos. Os resultados mostraram uma resposta inflamatória aguda nos primeiros dias com intenso infiltrado de células inflamatórias em todos os grupos avaliados. No entanto, os tecidos mostraram padrão de normalidade após 21 dias, em todos os grupos. Os compósitos obtidos a partir de biocerâmicas e polímeros melhoraram as propriedades físicas dos dois materiais isoladamente, especialmente pelas características termoplásticas do polímero, diminuindo a fragilidade da cerâmica permitindo sua utilização na prática. Foi observado histologicamente depósito de tecido fibroso, estes compósitos apresentaram excelente biocompatibilidade e o grupo que apresentou a maior taxa de degradação foi a dos compósitos BC/PLA com tetraciclina.

As aplicações na Odontologia de fosfatos de cálcio associados com polímeros no capeamento direto estão sendo desenvolvidas com grande interesse para aprimorá-las. No estudo de Zhang *et al.*, (2008) foi relatado o uso de cimento fosfato de cálcio associado com microesferas de PLGA com diferentes concentrações do fator de crescimento transformante (TGF- β 1) para capeamento direto. Os resultados indicaram diferenças significativas entre as amostras carregadas com maior quantidade de TGF- β 1 (400 ng TGF- β 1) em relação com os outros (0 ou 20 ng de TGF- β 1)($p < 0,05$), demonstrando que os compósitos com 400 ng TGF- β 1 foram capazes de promover a diferenciação das células estaminais da polpa em odontoblastos e induzir a formação de dentina terciária.

Apesar dos avanços para compreender os mecanismos moleculares que controlam a diferenciação dos odontoblastos e também a formação da ponte dentinária, o mecanismo exato

da cicatrização da exposição pulpar e a natureza do tecido duro formado após exposição pulpar ainda não foram bem esclarecidos (RANLY & GARCIA-GODOY, 2000). Assim, estudos sobre capeamento direto e seus efeitos no complexo dentino-pulpar são necessários para fornecer evidências fortes desses mecanismos (OLSSON *et al.*, 2006).

Baseados nestas considerações, este estudo se propõe a estudar a viabilidade de macrófagos peritoneais e fibroblastos humanos em contato com o compósito BC/PLGA, assim como, será verificada a aderência celular nas superfícies do material preparado *in vitro*, e serão avaliados parâmetros inflamatórios da resposta pulpar após capeamento direto *in vivo* em dentes de ratos.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a biocompatibilidade do compósito: Biocerâmica/ácido poli(lático-co-glicólico), em fibroblastos humanos e macrófagos peritoneais, *in vitro*, e a resposta pulpar após capeamento direto em dentes de rato após 30 e 60 dias *in vivo*.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Preparar compósitos BC/PLGA e avaliar a morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV)
2. Avaliar a citotoxicidade do compósito BC/PLGA em contato com fibroblastos da polpa humana (FP5) pelo reagente do MTT após 0, 24 e 48 horas.
3. Avaliar a citotoxicidade do compósito BC/PLGA em contato com macrófagos peritoneais (MP) pelo reagente do MTT após 48 horas.
4. Verificar a aderência celular por MEV dos fibroblastos humanos (FMM1) e dos macrófagos peritoneais (MP) após 24 horas.
5. Avaliar histologicamente a resposta inflamatória do tecido pulpar após capeamento direto com compósito BC/PLGA nos períodos de 30 e 60 dias.
6. Avaliar histologicamente a presença de ponte dentinária após capeamento direto nos períodos de 30 e 60 dias.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Polímero: ácido poli(lático-co-glicólico)(Birmingham Polymers, EUA).

Biocerâmica Osteosynt® (Einco Biomaterial, Ltda., Belo Horizonte, MG, Brasil).

Diclorometano solvente 106050 (Merck Chemical, Darmstadt, Alemanha).

Meio de cultura Eagle modificado por Dulbeco (DMEM-Cultilab, Campinas, SP, Brasil)

Meio de cultura RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute – Laboratório GIBCO, Grand Island, NY, EUA).

Kit MTT (CalBioChem, Canadá)

Di-metil-sulfóxido (Q BioGene, CA, EUA)

Tioglicolato (Difco™, Le Pont de Claix, França)

Tripsina (Sigma-Aldrich, LO, EUA).

4.2 Preparação do Material

Os compósitos foram preparados utilizando-se o polímero PLGA em proporção de 50:50 (PLA: PGA) dispersos em uma matriz da biocerâmica Osteosynt® de granulometria 80x60 Mesh (equivalente a 180x250 µm). A quantidade de PLGA: biocerâmica foi padronizada na proporção de 25: 75 p/p visando simular a proporção da composição (orgânica/inorgânica) do tecido ósseo (HOLLINGER & BATTISTONE, 1986; LIN *et al.*, 1998). Dessa forma a biocerâmica e o PLGA foram pesados em balança analítica e transferidos para um becker, sendo adicionado 2 mL de diclorometano para cada grama de biocerâmica. A mistura foi homogeneizada até evaporação do solvente.

4.2.1 Preparação das pastilhas e esterilização

Imediatamente após a homogeneização do BC/PLGA, a mistura foi colocada em tubos de vidro de 57 mm de comprimento por 7 mm de diâmetro (Figura 1A). Em seguida, para conformar em pastilhas, os cilindros foram cortados produzindo discos de dois mm de espessura no aparelho de corte preciso para materiais sólidos (Precision Saw, Buehler, Illinois,

USA) pertencente ao Laboratório de Dentística Restauradora do Departamento de Odontologia Restauradora da FO-UFMG (Figura 1B). As amostras foram deixadas durante uma semana ao ar livre para a eliminação do solvente e depois foram armazenadas em tubos *eppendorf* e esterilizadas com óxido de etileno no centro de esterilização especializada Curar Ltda., Belo Horizonte –MG.

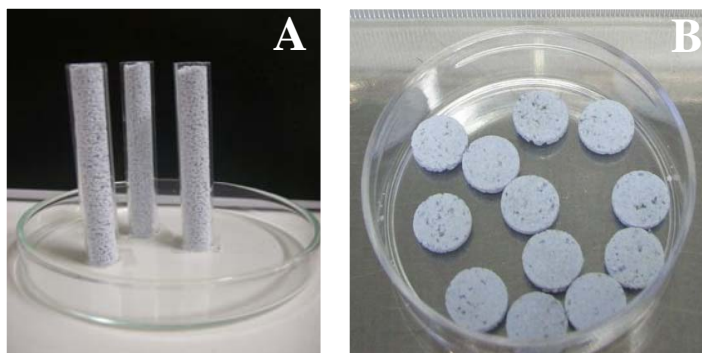


FIGURA 1. Preparação do compósito BC/PLGA (A) Materiais misturados nos tubos (B) Pastilhas cortadas.

4.3 Avaliação da viabilidade celular frente ao compósito BC/PLGA *in vitro*

4.3.1 Fibroblastos pulpaes humanos (FP5)

Os testes de viabilidade foram realizados no Laboratório de Pesquisa Básica “Professor Edmir Matson” da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FO-USP), sob a coordenação da Professora Doutora Márcia Martins Marques.

Foram utilizados fibroblastos de polpa humanos da linhagem celular FP5, estas células foram obtidas a partir de cultura primária de tecido pulpar dos dentes de pacientes com indicação de exodontia da clínica de cirurgia da FO-USP. As células foram mantidas em ambiente criogênico e posteriormente foram descongeladas em banho de água a 37°C por 60 segundos. Para remover a substância crioprotetora (Dimetil Sulfóxido-DMSO), o conteúdo da ampola foi transferido para um tubo falcon contendo 4 mL de meio de cultura e centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e o sedimento

ou “*pellet*” de células resultantes foi ressuspensionado em 1 mL de meio de cultura fresco. A suspensão de células foi transferida para uma garrafa plástica T 25 (25 cm² de área cultivável) contendo 5 mL de meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM- Cultilab, Campinas, SP, Brasil) contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma-Aldrich, LO, USA) e mantidas em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de dióxido de carbono.

Quando as células ocuparam 70% da área cultivável do frasco, ou seja, quando atingiram a confluência adequada, as células foram subcultivadas. O meio de cultura da garrafa foi removido e reservado em tubo de centrifugação e a monocamada celular lavada duas vezes com solução tampão fosfato-salina sem cálcio e magnésio (PBS), pH 7,2. Em seguida, as células foram tripsinizadas com 2 ml de solução de tripsina a 0,25% (Sigma-Aldrich, LO, EUA) durante 3 minutos a 37°C. A tripsina foi, então, inativada com DMEM e as células em suspensão foram transferidas para um tubo falcon e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente. O “*pellet*” de células resultante da centrifugação foi ressuspensionado em 1 mL de DMEM fresco.

Os fibroblastos foram semeados em concentração de 5×10^2 células/poço/mL, pois essas condições asseguram um crescimento exponencial por quatro dias (MATSUDA *et al.*, 1987).

4.3.2 Macrófagos peritoneais (MP)

O experimento foi realizado no laboratório do Departamento de Gnotobiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (LAGI-ICB-UFMG) sob a coordenação da Professora Doutora Leda Quercia Vieira.

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, com 6 a 8 semanas de idade. Os camundongos foram mantidos em condições ambientais controladas e alimentados com dieta comercial para roedores “*ad libitum*” (Nuvital, Nuvilab, Curitiba, PR, Brazil). Os animais foram mantidos no biotério do LAGI-ICB-UFMG. Os animais foram obtidos do Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB da UFMG.

Para a obtenção dos macrófagos peritoneais inflamatórios, 2 mL de tioglicolato 3% (DifcoTM, Le Pont de Claix, França) foram inoculados na cavidade peritoneal do animal 3 dias antes do sacrifício. No período estabelecido após injeção, os animais foram sacrificados por

decapitação e as células do peritônio foram obtidas após injeção de 10 mL de PBS a 4°C na cavidade peritoneal. A solução obtida do lavado peritoneal foi centrifugada a 1000 rpm por 10 minutos a 4°C. Em seguida as células foram contadas e ajustadas na concentração específica para os diferentes ensaios. As células foram incubadas em meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) (Laboratório GIBCO, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Nutricell, Campinas, Brasil), 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina e 2mM de L-glutamina (Gibco, Grand Island, NY, EUA).

Para os ensaios de viabilidade, os macrófagos peritoneais foram incubados em placas de 96 poços (NUNC) na concentração de 2×10^5 células/300µL (Rezende *et al.*, 2005).

4.4 Teste de viabilidade celular

O ensaio de viabilidade pelo reagente MTT (MOSSMAN, 1983) é um método colorimétrico sensível e quantitativo que mensura a viabilidade, proliferação e estado de ativação das células. Este ensaio baseia-se na capacidade de enzimas desidrogenase, presentes nas mitocôndrias de células viáveis, em converter o substrato metiltetrazólio (MTT) solúvel em água, no cristal de formazan, produto insolúvel em água.

Os biomateriais (BC, PLGA e BC/PLGA) foram colocados em tubos falcon estéreis, em concentração de 0,2 gramas do material por 1 mL de meio de cultura (ASTM, 1992; ISO, 1997, CAVALCANTI *et al.*, 2005). Em seguida foram aspirados, filtrados e aliquoteados para o plaqueamento. O formazan, de cor azul purpúrea, foi solubilizado e então, sua concentração determinada pela quantidade do número de células viáveis e pela densidade óptica em espectrofotômetro com filtro de 562 nm para os fibroblastos e 492 nm para os macrófagos. Foi adicionado 0,05 g de MTT (CalBioChem, Canadá) dissolvido em 10 ml de PBSA e após 4 h foi adicionado 200 µl de DMSO (Q BioGene, CA, EU) mais 25 µl de solução tampão de glicerina, preparada no mesmo momento no laboratório.

4.4.1 Grupos experimentais

Foram estabelecidos grupos iguais tanto para fibroblastos pulpares humanos quanto para macrófagos peritoneais com os materiais: compósito BC/PLGA, biocerâmica BC, PLGA e controle (apenas células).

Para os fibroblastos pulpares foram estabelecidos tempos de 0, 24 e 48 horas após contato com os meios condicionados (DMEM). Já para os macrófagos peritoneais a avaliação foi feita após 48 horas de estimulação constante com os meio condicionados (RPMI).

Um dia após o plaqueamento das células FP5 ou MP, os meios convencionais foram substituídos pelos meios condicionados com os biomateriais (BC, PLGA, BC/PLGA). Para os testes de viabilidade nos períodos predeterminados os meios condicionados dos poços foram aspirados e substituídos por 100 μ L de meios convencionais, DMEM fresco para fibroblastos e RPMI para macrófagos nos tempos predeterminados acima para cada tipo celular (Figura 2).

Em seguida, foram adicionados 10 μ L do reagente MTT em cada poço, incluindo os poços sem células (brancos), como controle para a leitura no espectrofotômetro. Em seguida, após 4h de incubação, em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e protegido da luz com folha de papel alumínio, 100 μ L do DMSO foi adicionado a cada poço e levadas para leitura de sua absorbância em espectrofotômetro ELISA (Amersham Biosciences, Biotrak II, Inglaterra) com leitor de 562 nm para os fibroblastos e de 492 nm para macrófagos. Os resultados foram plotados em forma de gráfico de barras.

Procedimento do ensaio MTT sobre os FP5 e MP



FIGURA 2. Procedimento do ensaio MTT para os FP5 e MP: (A) Materiais; (B) Meio condicionado; (C) Plaqueamento das células e (D) Placa após aplicação dos reagentes.

4.5 Avaliação da aderência celular ao compósito BC/PLGA

4.5.1 Fibroblastos gengivais humanos (FMM1)

Realizado no laboratório de cultura celular do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas (ICEX-UFMG), sob a coordenação da Profa. Dra. María Esperanza Cortes.

Para o ensaio de aderência celular foram utilizados fibroblastos gengivais humanos da linhagem celular FMM1, estas células foram obtidas a partir de cultura primária de tecido gengival dos pacientes com indicação de cirurgia da Clínica de Dentística da FO-USP e gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Márcia Martins Marques. O procedimento de descongelamento e cultivo foi feito com os mesmos parâmetros utilizados para os fibroblastos pulpare humanos (FP5) descritos no item 4.3.1. A concentração de fibroblastos gengivais usados para este estudo foi de 4×10^4 /mL por poço em placas de 24 poços (NUNC).

4.5.2 Macrófagos peritoneais (MP)

Realizado no laboratório LAGI-ICB-UFMG sob a coordenação da Profa. Dra. Leda Quercia Vieira. Para o ensaio de aderência celular foram utilizados macrófagos peritoneais inflamatórios obtidos seguindo os mesmos parâmetros usados para os MP descritos no item 4.3.2. A concentração de MP foi de 1×10^5 /mL por poço em placas de 24 poços (NUNC).

4.5.3 Ensaio da aderência celular para os FMM1 e MP

Com o auxílio da pipeta foram colocados cuidadosamente os volumes de cada grupo celular, com as concentrações de 1×10^4 /mL por poço para os FP5 e de 1×10^5 /mL por poço para MP, sobre as pastilhas do compósito BC/PLGA previamente distribuídas na placa de 24 poços (NUNC), em triplicata (Figura 3).

Grupos:

Foram estabelecidos grupos da seguinte forma: células FMM1 com BC/PLGA, células FMM1 na lamínula (controle), células MP com BC/PLGA e células MP na lamínula (controle).

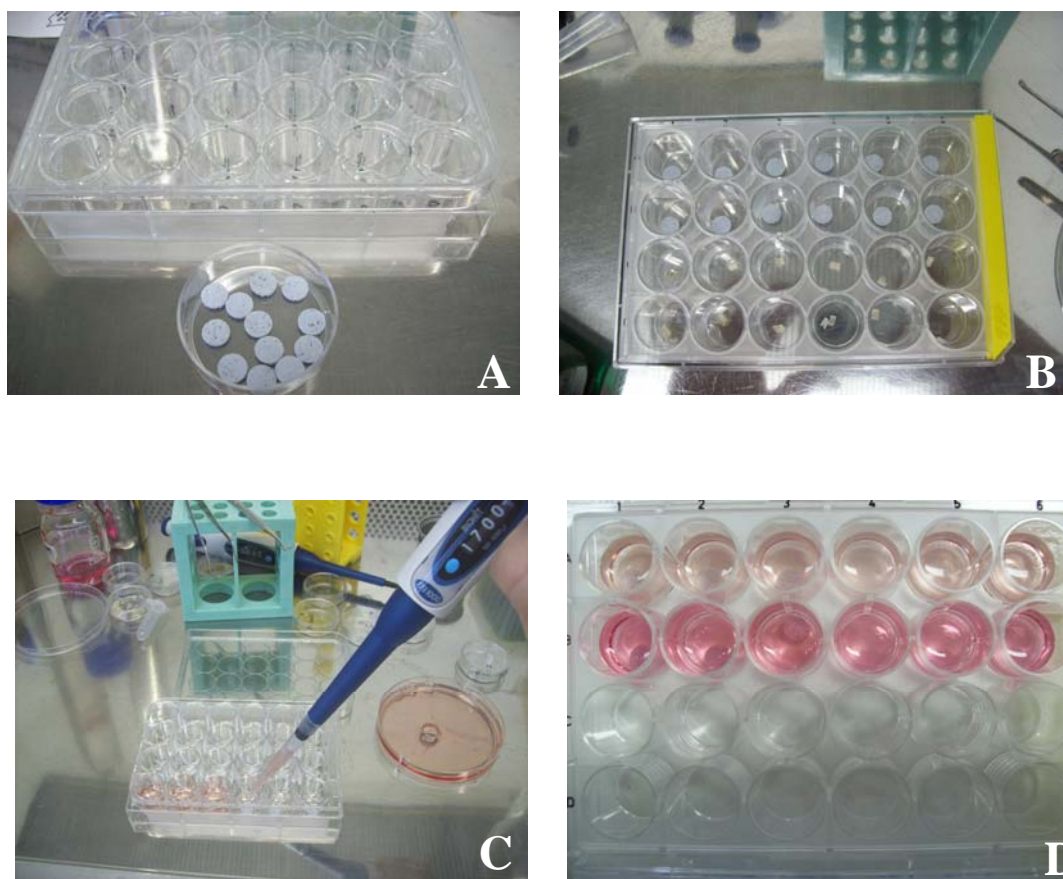
Procedimento do ensaio de aderência celular nas FMM1 e os MP

FIGURA 3. Procedimento do ensaio de aderência celular das FMM1 e os MP sobre pastilhas de composto BC/PLGA: (A) Pastilhas esterilizadas; (B) Distribuição das pastilhas na placa; (C) Plaqueamento das células sobre as pastilhas e (D) Placa após plaqueamento.

4.6 Processamento da amostra para microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Vinte e quatro horas após o plaqueamento e incubação a 37°C em estufa a 5% de CO₂ o meio foi retirado (FMM1 e FM), as pastilhas do compósito BC/PLGA e os controles foram lavados com tampão fosfato 0,2 M (pH 7,2- 7,4) para eliminar o meio de cultura restante; e fixados em solução de glutaraldeído a 3 % por duas horas em temperatura ambiente. A seguir, foram feitas duas lavagens com tampão fosfato 0,2 M para eliminação da substância fixadora. Posteriormente, foi adicionada a solução pós-fixadora de tetróxido de ósmio a 1 % no tampão por 20 minutos. Para remover a solução pós-fixadora, foram feitas três lavagens, em intervalos de cinco minutos, com tampão fosfato 0,2 M. Em seguida, as amostras foram desidratadas em soluções crescentes (50%, 70%, 80%, 90%, 96% e 100%) de álcool (BOZZOLA & RUSSELL, 1992).

Posteriormente, as amostras foram secas no aparelho de ponto crítico de CO₂ (CPD 020 Balzers, Wiesbaden, Alemanha) no Centro de Microscopia Eletrônica do ICB (CEMEL-ICB). Logo após, as amostras foram montadas nas bases metálicas apropriadas (*Stubs* de alumínio) segundo os grupos experimentais e submetidas ao processo de sputtering, cobertas com uma camada de íons de ouro de 10nm (Balzers SCD 040, Wiesbaden, Alemanha) no Laboratório de microanálise do Departamento de Física do ICEX-UFMG. A análise da microscopia eletrônica foi feita no Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (FEI Quanta, Eindhoven, Holanda)

4.7 Avaliação da resposta pulpar *in vivo*

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

4.7.1 Cálculo amostral

No estudo piloto realizado se calculou uma perda de 20% e 80% de sucesso. O cálculo do tamanho da amostra (n) foi realizado de acordo com Kirkwood (1996) e Pereira (1995). Baseados nos resultados do estudo piloto, o nível de prevalência foi de 80%, o nível de significância (1,96) e a precisão requerida para a estimativa (0,1).

$$n = \frac{(Z1-Z2)^2 \cdot (p(1-p))}{(d)^2}$$

$$n = \frac{(1.96)^2 \cdot (0,8)(0,2)}{(0,2)^2}$$

$$n = 15.36 \Rightarrow 16 \text{ dentes como mínimo}$$

$$n \text{ final} = 16 + 20\% (16) \Rightarrow \mathbf{20 \text{ dentes por grupo}}$$

O n para o estudo foi de 16 dentes como mínimo por grupo e adicionando 20% de perdas (3,2 \Rightarrow 4), o n final foram 20 dentes no grupo teste, concordando ainda com o Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFMG (CETEA-UFMG) em relação às propostas para a utilização de novos materiais.

4.7.2 Procedimento de capeamento pulpar direto

Foram utilizados ratos machos adultos de espécie *Rattus norvergicus*, da ordem Rodentia e linhagem *Wistar*, com idade de 4 meses aproximadamente e com peso de 250 até 270 gramas, procedentes do CEBIO do ICB da UFMG. As condições de manutenção foram padronizadas segundo as normas de alimentação e água “*ad libitum*”, temperatura entre 23 - 25°C e em ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Os dentes escolhidos foram os primeiros molares superiores direitos e esquerdos, e foram fixados unicamente os dentes que apresentaram a restauração em boas condições clínicas como critério de inclusão para avaliação final.

Os grupos experimentais foram: compósito Biocerâmica/PLGA (BC/PLGA), biocerâmica (BC), PLGA e controle positivo feito com hidróxido de cálcio P.A. e água destilada.

Os ratos foram anestesiados por injeção intramuscular com uma seringa esterilizada de 1 mL, utilizando-se uma formulação composta por 10 mL de anestésico (Ketamina 10%) e 7,5

mL de Relaxante muscular (Xilazina 10%) em uma quantidade de 0,1ml/100g do peso do rato (MALTOS, *et al.*, 2004; GALA-GARCÍA *et al.* 2008; GALA-GARCÍA *et al.* 2010).

Uma mesa operatória foi padronizada e construída especialmente para trabalhar em dentes de ratos seguindo técnica descrita por Houston (1964) e Sampaio (1967).

O animal foi colocado na mesa de procedimento em posição supina e contido com fita crepe nas quatro patas. O isolamento absoluto foi realizado com grampos previamente confeccionados, medindo 9 mm de comprimento por 5,5 mm de largura adaptado ao dente do rato através de dispositivos específicos esterilizados em autoclave (121°C) por um período de 30 minutos, de acordo com as normas da Comissão de Biosegurança da UFMG (COBIO-UFMG). A seguir, foi colocado o dique de borracha (Madeitex®) desinfetado com álcool iodado, deixando secar por dois minutos, e lavado com bolinha de algodão estéril embebida em água destilada.

A abertura foi feita aprofundando a parte ativa da broca cone invertida N° 34 de baixa rotação (SS White®) até conseguir uma Classe I na face oclusal do dente com refrigeração a ar intermitentemente. A exposição pulpar nos dentes escolhidos foi feita com sonda exploradora (Maillefer®) esterilizada e padronizada com uma angulação da parte ativa. Seguidamente, foram lavadas com água destilada e secadas até conseguir a hemostasia com bolinha de algodão estéril.

Após a exposição, os materiais foram colocados de acordo com grupos previamente definidos: Compósito BC-PLGA, Biocerâmica, PLGA, Ca(OH)₂ e água destilada como controle negativo (Artigo 1). Imediatamente após, foi colocada uma matriz metálica previamente esterilizada com diâmetro padronizado como interface para proteger o material de capeamento da restauração com amálgama. O amálgama de prata (cápsula G580®), utilizado foi condensado e brunido (GALA-GARCÍA *et al.*, 2008) (Figura 4).

Procedimento de capeamento pulpar direto

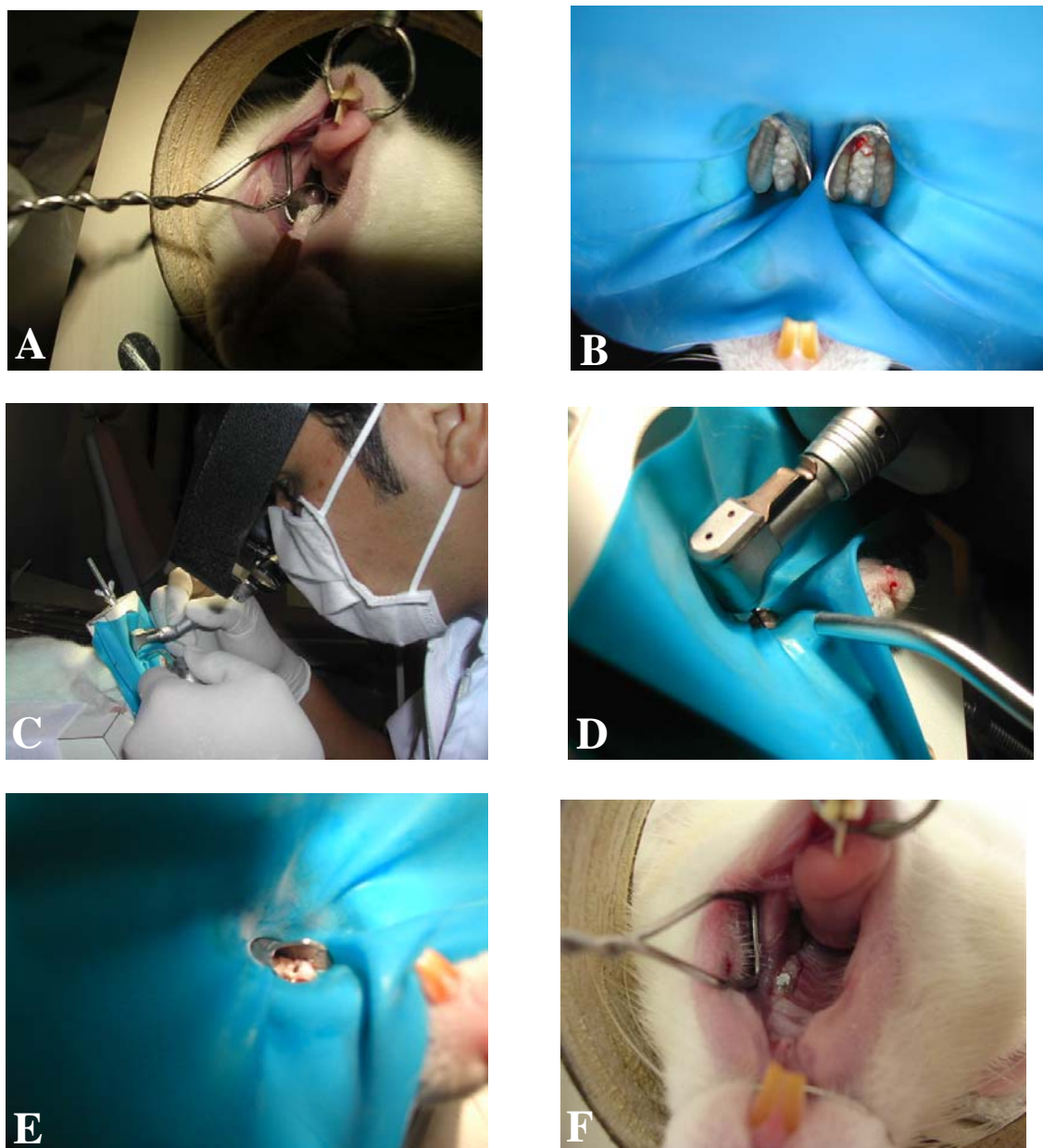


FIGURA 4. Capeamento pulpar direto no primeiro molar superior esquerdo do rato:
(A) Animal anestesiado na mesa cirúrgica; (B) isolamento absoluto do primeiro molar superior esquerdo; (C) e (D) preparação da cavidade; (E) exposição; (F) colocação do material e restauração com amalgama de prata.

O sacrifício do animal foi realizado com prévia anestesia, com injeção intramuscular da mistura de 10 mL de anestésico (Ketamina 10%) e 7,5 mL de relaxante muscular (Xilazina 10%) em uma proporção de 0,1 mL/100g do peso do rato. Usou-se a técnica de deslocamento cervical (CETEA-UFMG, 2004) nos períodos de tempo predeterminados (TABELA 1 e 2). Os maxilares foram removidos e fixados em solução de formalina tamponada a 10% por 48 horas (ØRSTAVIK & MJÖR, 1988).

TABELA 1. Distribuição do número de dentes de ratos após 1, 7, 14 e 30 dias de capeamento pulpar. Estudo Piloto. (Artigo 1).

Material	N° de dentes segundo períodos estabelecidos				
	1 dia	7 dias	14 dias	30 dias	Total
Compósito BC/PLGA	4	4	4	4	16
Biocerâmica	3	3	3	3	12
Controle Positivo Ca(OH)₂	4	4	4	4	16
Controle negativo H₂O estéril	2	2	2	2	8
Total	13	13	13	13	52

TABELA 2. Distribuição do número de dentes de ratos após 30 e 60 dias de capeamento pulpar (Artigo 2)

Material	N° de dentes segundo períodos estabelecidos		
	30 dias	60 dias	Total
Compósito BC/PLGA	20	20	40
Biocerâmica	20	20	40
PLGA	10	10	20
Controle Positivo Ca(OH)₂	20	20	40
Total	70	70	140

4.7.3. Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa em animal (N°167/2007 CETEA-UFMG) e do Comitê de Ética em pesquisa em humanos da USP, SP (COEP N° 47/06).

4.8 Processamento histológico para microscopia óptica

O processamento histológico foi realizado no laboratório de Biologia de Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biológicas ICB/UFMG sob a coordenação da Professora Dra Gerluza Borges Silva.

A desmineralização dos dentes foi realizada após lavagem, os maxilares contendo os dentes foram colocados em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 10% durante 20 dias com períodos de troca a cada quatro dias até conseguir uma consistência adequada. O processamento histológico foi realizado em triplicata pelos métodos histo-técnicos de rotina.

- a. Desidratação progressiva em álcool etílico de 60% até 99,6%.
- b. Diafanização com xylol como reagente intermediário
- c. Impregnação em parafina ou em resina
- d. Inclusão em metacrilato
- e. Microtomia: cortes de 5 micrômetros
- f. Coloração por hematoxilina-eosina.

Os cortes histológicos foram observados após 30 e 60 dias com a finalidade de avaliar a resposta pulpar e a evolução da resposta tecidual após o capeamento. Tendo em consideração os eventos de inflamação, resolução e formação de ponte dentinária.

4.8.1 Critérios de Avaliação

Os critérios empregados para o tecido pulpar foram a avaliação e classificação das alterações teciduais pulpares realizadas segundo os parâmetros descritos na literatura por Faraco & Holland, 2004; Briso *et al.*, 2006 e Accorinte *et al.*, 2008, a seguir:

Estado geral da polpa

- 1 - Sem reação inflamatória
- 2 - Com reação inflamatória
- 3 - Abscesso
- 4 - Necrose

Resposta inflamatória

- 1 - Tecido normal sem resposta inflamatória evidente.
- 2 - Leve infiltrado celular inflamatório com leucócitos polimorfonucleares ou mononucleares dispersos, próximos à área exposta.
- 3 - Moderado a denso infiltrado celular envolvendo a área subjacente à exposição.
- 4 - Severo infiltrado celular inflamatório envolvendo metade ou mais do volume pulpar, com presença de abscesso.

Similarmente, os critérios usados para avaliação do tecido dentinário neoformado foram adequados segundo Faraco & Holland, 2004; Briso *et al.*; 2006 e Accorinte *et al.*, 2008 segundo a :

Formação de Tecido Mineralizado:

- 1 – Presença
- 4 – Ausência

Localização:

- 1 - Fechamento da área de exposição sem invadir o espaço da polpa.
- 2 - Formação do tecido dentinário invadindo a polpa ao lado das paredes dentinárias.
- 3 - O tecido dentinário alcançou até a parede dentinária.
- 4 - Nenhuma deposição tecido dentinário ou só nas paredes da exposição.

Continuidade

- 1 – Completa.
- 2 - Mínima comunicação entre o material para capeamento com a polpa dental.
- 3: - Só deposição de tecido dentinário nas paredes laterais da cavidade exposta.
- 4 - Ausência de tecido dentinário e ausência de tecido dentinário na parede.

Morfologia

- 1 - Dentina ou dentina com tecido dentinário irregular.
- 2 - Só deposição de tecido dentinário irregular.
- 3 - Só uma pequena camada de tecido dentinário.
- 4 - Nenhuma presença de tecido dentinário.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACCORINTE, M. L.; LOGUERCIO, A.D.; REIS, A.; CARNEIRO, E.; GRANDE R. H.; MURATA, S. S.; HOLLAND, R. Response of human dental pulp capped with MTA and calcium hydroxide powder. *Oper Dent.*, v. 33, n. 5, p. 488-495, Sep. 2008.
2. ALLIOT-LICHT, B.; JEAN, A.; GREGOIRE, M. Comparative effects of calcium hydroxide and hydroxyapatite on the cellular activity of human pulp fibroblasts in vitro. *Archs Oral Biol.*, v. 39, n. 6, p. 481-489, Jun. 1994.
3. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Annual Book of ASTM Standars. Medical devices Wes Conshohocken: ASTM; v. 13.01, p. 172-176, 1992.
4. ASGARY, S.; EGHBAL, M. J.; PARIROKH, M.; GHODDUSI, J.; KHEIRIEH, S.; BRINK, F. Comparison of mineral trioxide aggregate's composition with Portland cements and a new endodontic cement. *J Endod.*, v. 35, n. 2, p. 243-250, Feb. 2009.
5. BOZZOLA, J. J. & RUSSELL, L. D. *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*. Jones and Bartlett Publishers, Boston. 1992. 542 p.
6. BRISO, A. L.; RAHAL, V.; MESTRENER, S. R.; DEZAN JUNIOR, E. Biological response of pulps submitted to different capping materials. *Braz Oral Res.*, v. 20, n. 3, p. 219-225.Sep. 2006.
7. CAVALCANTI, B. N.; RODE, S. M.; MARQUES, M. M. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. *Int Endod J.*, v. 38, n. 8, p. 505-509, Aug. 2005.
8. CHRISTENSEN, G. J. Pulp Capping, *JADA*, v.129, p. 1297-1299, Sept. 1998.
9. CIAPETTI, G.; AMBROSIO, L.; SAVARINO, L.; GRANCHI, D.; CENNI, E.; BALDINI, N.; PAGANI, S.; GUIZZARDI, S.; CAUSA, F.; GIUNTI, A. Osteoblast growth and function in porous poly ϵ -caprolactone matrices for bone repair: a preliminary study. *Biomaterials*, v. 24, n. 21, p. 3815-3824, Sep. 2003.
10. DESAI, S. & CHANDLER, N. Calcium hydroxide-based root canal sealers: a review. *J Endod.* v. 35, n. 4, p. 475-480, Apr. 2009 .
11. DILLOW, A. K. & TIRRELL, M. Targeted cellular adhesion at biomaterial interfaces. *Curr Opin Solid Stat Mat Sci.*, v. 3, p. 252-259, Jun. 1998.

12. EL-GHANNAM, A. Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering. *Expert Rev Med Devices.*, v. 2, n. 1, p. 87-101, Jan. 2005.
13. ESTRELA, C. & PESCE, H. F. Chemical analysis of the liberation of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide pastes in connective tissue of the dog. Part I. *Braz Dent J.* v. 7, n. 1, p. 41-46. Jan. 1996.
14. ESTRELA, C & PESCE, HF. Chemical analysis of the formation of calcium carbonate and its influence on calcium hydroxide pastes in connective tissue of the dog--Part II. *Braz Dent J.* v. 8, n. 1, p. 49-53. Jan. 1997.
15. FARACO JR, I. M. & HOLLAND, R. Histomorphological response of dogs' dental pulp capped with white mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J.*, v. 15, n. 2, p. 104-108, Apr. 2004.
16. FARHAD, A. & MOHAMMADI, Z. Calcium hydroxide: a review. *Int Dent J.*, v. 55, n. 5, p. 293-301, Oct. 2005.
17. FÉDÉRATION DENTAIRE INTERNATIONALE, Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. *Int Dent J.*, v. 30, n. 2 p. 140-188. Jun. 1980.
18. GALA-GARCIA, A.; TEIXEIRA, K. I. R.; MENDES, L. L.; SOBRINHO, A. P. R.; SANTOS, V. R.; CORTES, M. E. Effect of *Aloe vera* on Rat Pulp Tissue. *Pharmaceutical Biol.*, v. 46, n. 5, p. 302–308. May. 2008.
19. GALA-GARCIA, A.; TEIXEIRA, K. I.; WYKROTA, F. H.; SINISTERRA, R. D.; CORTÉS, M. E. Bioceramic/poly (glycolic)-poly (lactic acid) composite induces mineralized barrier after direct capping of rat tooth pulp tissue. *Braz Oral Res.*, v. 24, n. 1, p. 8-14, Mar. 2010.
20. GOLDBERG, M. & SMITH, A. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp. A biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med.*, v. 15, n. 1. p. 13–27, Jan. 2004.
21. GOLDBERG, M.; FARGES, J. C.; LACERDA-PINHEIRO, S.; SIX, N.; JEGAT.; N.; DECUP, F.; SEPTIER, D.; CARROUEL, F.; DURAND, S.; CHAUSSAIN-MILLER, C.; DENBESTEN, P.; VEIS, A.; POLIARD, A. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacol Res.*, v. 58, n. 2, p. 137-147, Aug. 2008.
22. GORDON, S. & TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.*, v. 5, n. 12, p. 953-964. Dec. 2005.

23. GRONTHOS, S.; BRAHIM, J.; LI, W.; FISHER, L. W.; CHERMAN, N.; BOYDE, A.; DENBESTEN, P.; ROBEY, P. G.; SHI, S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.*, v. 81, n. 8, p. 531-535, Aug. 2002.
24. HANKS, C. T.; WATAHA, J. C.; SUN, Z. *In vitro* models of biocompatibility: a review. *Dent Mater.*, v.12, n. 3, p. 186-93, May. 1996.
25. HASHIMOTO-UOSHIMA, M.; ISHIKAWA, I.; KINOSHITA, A.; WENG, H.T.; ODO, S. Clinical and histologic observation of replacement of biphasic calcium phosphate by bone tissue in monkeys. *Int J Periodontics Restorative Dent.*, v. 15, p. 204-213, Apr. 1995.
26. HAYASHI, Y.; IMAI, M.; YANAGIGUCHI, K.; VILORIA, I. L.; IKEDA, T. Hydroxyapatite applied as direct pulp capping medicine substitutes for osteodentin. *J Endod.*, v. 25, n. 4, p. 225-229, Apr. 1999.
27. HENCH, L. L. The challenge of orthopaedic materials. *Curr Orthop.* v. 14, n. 1 p. 7-15, Jan. 2000.
28. HIGASHI, T. & OKAMOTO, H. Influence of particle size of hydroxyapatite as a capping agent on cell proliferation of cultured fibroblasts. *J Endod.*, v. 22, n. 5, p. 236-239, May. 1996.
29. HIGASHI, T. & OKAMOTO, H. Influence of particle size of calcium phosphate ceramics as a capping agent on the formation of a hard tissue barrier in amputated dental pulp. *J Endod.*, v. 22, n. 6, p. 281-283, Jun. 1996.
30. HOLLINGER, J. O. & BATTISTONE, G. C. Biodegradable bone repair materials. *Clin Orthop Rel Res.*, v. 207, p. 290-305, Jun. 1986.
31. HØRSTED-BINDSLEV, P.; VILKINIS, V.; SIDLAUSKAS, A. Direct capping of human pulps with a dentin bonding system or with calcium hydroxide cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, v. 96, n. 5, p. 591-600, Nov. 2003.
32. HOUSTON, W. J. B. A new design of rat mouth prop. *J Dent Res.*, v. 43, n. 1, p. 458. May. 1964.
33. HU, C. C.; ZHANG, C.; QIAN, Q.; TATUM, N. B. Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. *J Endod.*, v. 24, n. 11, p. 744-751, Nov. 1998.
34. HUANG, F. M. & CHANG, Y. C. Cytotoxicity of dentine-bonding agents on human pulp cells *in vitro*. *Int Endod J.*, v. 35, n. 11, p. 905-909, Nov. 2002.

35. HUANG, M. H.; LI, S.; HUTMACHER, D. W.; SCHANTZ, J. T.; VACANTI, C. A.; BRAUD, C.; VERT, M. Degradation and cell culture studies on block copolymers prepared by ring opening polymerization of epsilon-caprolactone in the presence of poly (ethylene glycol). *J Biomed Mater Res A.*, v. 69, n. 3, p. 417-427, Jun. 2004.
36. INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION 10993-5. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, 1999.
37. INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION 10993-6. Biological evaluation of medical devices - Part 6: Tests for local effects after implantation, 1994.
38. ISHIZAKI, N. T.; MATSUMOTO, K.; KIMURA, Y.; WANG, X.; YAMASHITA, A. Histopathological study of dental pulp tissue capped with enamel matrix derivative. *J Endod.*, v. 29, n. 3 p. 176-179, Mar. 2003.
39. JEPSEN, S.; ALBERS, H. K.; FLEINER, B.; TUCKER, M.; RUEGER, D.; Recombinant Human Osteogenic Protein-1 induces dentin formation: na experimental study in Miniature swine. *J Endod.*, v. 23, n. 6, p. 378-382, Jun. 1997.
40. JOE, Editorial Board. Uses of calcium hydroxide: an online study guide. *J Endod.*, v. 34, n. 5, p. 87-92. May. 2008.
41. KAIDA, H.; HAMACHI, T.; ANAN, H.; MAEDA, K. Wound healing process of injured pulp tissues with emdogain gel. *J Endod.*, v. 34, n. 1, p. 26-30, Jan. 2008.
42. KAKEHASHI, S.; STANLEY, H. R.; FITZGERALD, R. J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.*, v. 20, p. 340-349, Sep. 1965.
43. KARDOS, T. B.; HUNTER, A. R.; HANLIN, S. M.; KIRK, E. E. Odontoblast differentiation: a response to environmental calcium? *Endod Dent Traumatol.*, v. 14, n. 3, p. 105–111. Jun. 1998.
44. KIRKWOOD, B. R. *Essentials of Medical Statistics*. 2th Ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1988-1996. 200p.
45. KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*, v. 75, n. 1, p. 1-18, Jan. 2010.
46. LEGEROS, R. Z. Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review. *Adv Dent Res.*, v. 2, n. 1, p. 164-180, Aug. 1988.
47. LEGEROS, R. Z. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem Rev.*, v. 108, n. 11, p. 4742-4753, Nov. 2008.

48. LEGEROS, R. Z.; LIN, S.; ROHANIZADEH, R.; MIJARES, D.; LEGEROS, J. P. Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *J Mater Sci Mater Med.*, v. 14, n. 3, p. 201-209, Mar. 2003.
49. LI, S. Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids. *J Biomed Mater Res.* v. 48, n. 3, p. 342-353, Apr. 1999.
50. LIN, F. H.; YAO, C. H.; SUN, J. S.; LIU, H. C.; HUANG, C. W. Biological effects and cytotoxicity of the composite composed by tricalcium phosphate and glutaraldehyde cross-linked. *Biomaterials*, v. 19, p. 905-917, May. 1998.
51. LOBO, S. E.; WYKROTA, F. H.; OLIVEIRA, A. C.; KERKIS, I.; MAHECHA, G. B.; ALVES, H. J. Quantification of bone mass gain in response to the application of biphasic bioceramics and platelet concentrate in critical-size bone defects. *J Mater Sci Mater Med.*, v. 20, n. 5, p. 1137-1147, May. 2009.
52. MALTOS, K. L. M.; MENEZES, G. B.; CALIARI, M. V.; ROCHA, O. A.; SANTOS, J. M. M.; ALVES, D. L. F.; DUARTE, I. D. G.; FRANCISCHI, J. N. Vascular and cellular responses to pro-inflammatory stimuli in rat dental pulp *Arch Oral Biol.*, v. 49, p. 443-450, Jun. 2004.
53. MATSUDA, T.; YAMAUCHI, K.; ITO, G.; The influence of bioglass on the growth of fibroblasts. *J Biomed Mater Res.*, v. 21, n. 4, p. 499-507, Apr. 1987.
54. MJOR, I. A., SVEEN, O. B., HEYERAAS, K. J. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 1: normal structure and physiology. *Quintessence Int.*, v. 32, n. 6, p. 427-446, Jun. 2001.
55. MOSSMAN, T. Colorimetric assay for cellular growth and survival. Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth.*, v. 65, n. 1, p. 55-63, Dec. 1983.
56. OLSSON, H.; PETERSSON, K.; ROHLIN, M. Formation of hard tissue barrier after pulp capping in humans. A systematic review. *Int Endod J.*, v. 39, p. 429-442, Jun. 2006.
57. ØRSTAVIK, D. & MIJÖR, I. A. Histopatologic and X-ray microanalysis of the subcutaneous tissue response to endodontic sealers. *J Endod.*, v. 14, n. 1, p. 13-23, Jan.1988.
58. ØRSTAVIK, D. & MJÖR, I. A. Usage test of four endodontic sealers in Macaca fascicularis monkeys. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.*, v. 73, n. 3, p. 337-344, Mar. 1992.

59. PAMEIJER, C. H. & STANLEY, H. R. The disastrous of the “total etch” technique in primates. *Am J Dent.*, v. 11, p. 45-54, Jan. 1998.
60. PATARO, A. L.; OLIVEIRA, M. F.; TEIXEIRA, K. I. R.; TURCHETTI-MAIA, R. M. M.; LOPES, M. T. P.; WYKROTA, F. H. L.; SINISTERRA, R. D.; CORTÉS, M. E. Polymer: Bioceramic Composites Optimization By Tetracycline Addition. *Int J Pharm.*, v. 336, n. 1. p. 75-81, Nov. 2007.
61. PEREIRA, M. G. *Epidemiologia: Teoria e prática*. 4th Ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1995. 355p.
62. PIZZOFERRATO. A.; CIAPETTI, G.; STEA, S.; CENNI, E.; ARCIOLA, C. R.; GRANCHI, D.; SAVARINO, L. Cell culture methods for testing biocompatibility. *Clin Mater.*, v. 15, n. 3, p. 173-190, Jun. 1994.
63. POLYZOIS, G. L. In vitro evaluation of dental materials. *Clin Mater.*, v. 16, n. 1, p. 21-60, Jan. 1994.
64. RANLY, D. M. & GARCIA-GODOY, F. Current and potential pulp therapies for primary and young permanent teeth. *J Dent.*, v. 28, n. 3, p. 153-161, Mar. 2000.
65. REZENDE, T. M; VARGAS, D. L.; CARDOSO, E. P.; SOBRINHO, A. P. R.; VIEIRA, L. Q. Effect of mineral trioxide aggregate on cytokine production by peritoneal macrophages. *Int Endod J.*, v. 38, n. 12, p. 896-903, Dec. 2005.
66. RUHÉ, P. Q.; HEDBERG-DIRK, E. L.; PADRON, N. T.; SPAUWEN, P. H.; JANSEN, J. A.; MIKOS, A. G. Porous poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement composite for reconstruction of bone defects. *Tissue Eng.*, v. 12, n. 4, p. 789-800, Apr. 2006.
67. SAMPAIO, P. Placement of a rubber dam on rat molars. *J Dent Res.*, v. 46, n. 5, p.1102, Sep.1967.
68. SASAKI, T. & KAWAMATA-KIDO, H. Providing an environment for reparative dentine induction in amputated rat molar pulp by high molecular-weight hyaluronic acid. *Arch Oral Biol.*, v. 40, n. 3, p. 209-219, Mar. 1995.
69. SCHMALZ, G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clin Oral Investig.*, v. 1, n. 4, p. 154-62, Dec. 1997.
70. SCHRODER, U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation and differentiation. *J Dent Res.*, v.64, p.541-548, Apr. 1985.

71. 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 Traumatol.*, v. 16, n. 6, p. 240-250, Dec. 2000.
72. SHIKINAMI, Y. & OKUNO, M. Bioreabsorbable devices made of forget composites of hydroxiapatyte (HA) particles and poly-L-lactide (PLLA): Part I. Basic characteristics. *Biomaterials*, v. 20, n. 9, p. 859-877, May. 1999.
73. SILVA, G. A.; LANZA, L. D.; LOPES-JÚNIOR, N.; MOREIRA, A.; ALVES, J. B. Direct pulp capping with a dentin bonding system in human teeth: a clinical and histological evaluation. *Oper Dent.*, v. 31, n. 3, p. 297-307, May. 2006.
74. STANISLAWSKI, L.; CARREAU, J. P.; POUCHELET, M.; CHEN, Z. H.; GOLDBERG, M. In vitro culture of human dental pulp cells: some aspects of cells emerging early from the explant. *Clin Oral Investig.*, v. 1, n. 3, p. 131-140. Sep. 1997.
75. STOCKTON, L. W. Vital pulp capping: a worthwhile procedure. *J Can Dent Assoc.*, v. 65, n. 6, p. 328-331, Jun. 1999.
76. STRAUSS-AYALI, D.; CONRAD, S. M.; MOSSER, D. M. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J of Leukoc Biol.*, v. 82, n. 2, p. 244-252, Aug. 2007.
77. TORABINEJAD, M. & CHIVIAN, N. Clinical applications of Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod.*, v. 25, n. 3, p. 197-205, Mar. 1999.
78. VAN WYK, C. W.; OLIVEIRA, A. MARITZ, J. S. Cultured fibroblasts: are they suitable for in vitro cytotoxicity testing?. *J Oral Pathol Med.*, v. 30, n. 3, p. 168-77, Mar. 2001.
79. VERT, M.; LI, S.; GARREAU, H. New insights on the degradation of bioresorbable polymeric devices based on lactic and glycolic acids Review *Clin. Mater.*, v. 10, n. 1-2, p. 3-8. Jan. 1992.
80. WYKROTA, L. L.; GARRIDO, C. A.; WYKROTA, F. H. L.; CURY, V. C. F.; FILHO, J. A. Clinical evaluation of biphasic calcium phosphate ceramic use in orthopaedic lesions. *Bioceramics*, v. 11, p. 614-644, Nov. 1998.
81. WYKROTA, L. L.; WYKROTA, F.H.L.; GARRIDO, C.A. Long term bone regeneration in large human defects using calcium-phosphate particulate. In: DAVIES, J. E. *Bone Engineering*. 1^a ed. Toronto: Rainbow Grafic and Printing Ltd., 1999, cap. 48, p. 516-525.

82. YAMADA, K. M. & GEIGER, B. Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol.* v. 9, n. 1, p. 76-85, Feb. 1997.
83. YU, N. Y.; SCHINDELER, A.; LITTLE, D. G.; RUYSS, A. J. Biodegradable poly(alpha-hydroxy acid) polymer scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.*, v. 93, n. 1, p. 285-295, Apr. 2010.
84. ZHANG, W.; WALBOOMERS, X. F.; JANSEN, J. A. The formation of tertiary dentin after pulp capping with a calcium phosphate cement, loaded with PLGA microparticles containing TGF-b1. *J Biomed Mater Res A.*, v. 85, n. 2, p. 439–444, May. 2008.

Bioceramic/Poly (glycolic)-poly (lactic acid) composite induces mineralized barrier after direct capping of rat tooth pulp tissue

Alfonso Gala-Garcia^(a)
 Karina Imaculada Rosa Teixeira^(a)
 Francisco Henrique Lana
 Wykrota^(b)
 Rubén Dario Sinisterra^(c)
 Maria Esperanza Cortés^(d)

^(a)MSc in Dentistry Clinic; ^(d)PhD in Integrative Clinic – Restorative Dentistry Department of the School of Dentistry, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

^(b)Orthopedics Specialist, São Bento Hospital, Belo Horizonte, MG, Brazil.

^(c)PhD in Chemistry, Chemistry Department, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Abstract: The aim of this study was to observe the histopathological pulp response following direct pulp capping of mechanically exposed teeth in rats with a composite of beta-tricalcium phosphate-hydroxyapatite bioceramic (BC) and poly (glycolic)-poly (lactic acid) (PLGA) material or a calcium hydroxide [Ca(OH)₂] material, compared to BC alone and a negative control of water. Pulp of the maxillary molars was exposed, followed by capping with the experimental material. The pulpal tissue response was assessed post-operatively at 1, 7, 14 and 30 d, followed by histological analysis. The Ca(OH)₂ group exhibited severe acute inflammatory cell infiltration at day 14. However after 30 d, a new hard tissue with macro porous obliteration of the pulp chamber and a characteristic necrotic area had appeared. BC and Ca(OH)₂ capping were associated with moderate inflammation and dentinal bridge similar. Meanwhile, in the BC/PLGA composite group, there was moderate inflammatory infiltrate and formation of a dense and complete dentinal bridge. In conclusion, the BC/PLGA composite material showed a large zone of tertiary dentin, and effectively reorganized the dentin-pulp complex.

Descriptors: Dental pulp capping; Polymers; Calcium hydroxide; Dentin.

Introduction

In vivo studies have confirmed the advantages of hydroxyapatite (HA)/calcium phosphate bioceramic (BC) materials with a porous structure for tissue growth,¹ however, the application of porous hydroxyapatite ceramics is limited, as their strength decreases exponentially with the pore volume ratio. Pulp capping provides adequate protection of vital pulp exposed to the oral environment. A biologically acceptable treatment was achieved with the advent of materials that promote pulp cells to stimulate deposition of a hard tissue bridge. Calcium hydroxide [Ca(OH)₂], dentin adhesives, hydroxyapatite, mineral trioxide aggregate, tricalcium phosphate, allogenic dentin matrix, and bone morphogenetic protein have been widely studied with regard to hard tissue barrier formation after pulp exposition to improve upon direct pulp capping.^{2,3} The synthetic calcium phosphate (CaP) biomaterials, hydroxyapatite and tricalcium phosphate ceramic, are used in orthopaedic treatment and

Corresponding author:

Maria E. Cortés
 Faculdade de Odontologia
 Departamento de Odontologia Restauradora
 Universidade Federal de Minas Gerais
 Av. Antônio Carlos, 6627
 CEP: 31270-901
 Belo Horizonte - MG - Brazil
 E-mail: mecortes@ufmg.br

Received for publication on Apr 16, 2009
 Accepted for publication on Sep 10, 2009

have been developed as pulp capping agents based on their biocompatibility and potential to stimulate osteogenesis. Studies have demonstrated that pre-fabricated PLGA/CaP cement loaded with 400 ng of TGF- β 1 can trigger resident stem cells in the pulp to differentiate into odontoblast-like cells and induce the formation of tertiary dentin.⁴ The cellular mechanism of the dissolution/precipitation process involved a formation of carbonate hydroxyapatite (CHA) on CaP surfaces *in vivo*. Acidity of the environment due to cellular activity (macrophages, osteoclasts) causes partial dissolution of CaP, leading to an increased saturation of the biologic or physiological fluid. This saturation results in precipitation of CHA with incorporated CO₃, other ions, and proteins.⁵

The BC micro-macro porous of β -tricalcium phosphate (β TCP) with hydroxyapatite (HA) has been studied and effectively used as biodegradable material for bone replacement.⁶⁻⁸ The composite formed by BC and poly (glycolic)-poly (lactic acid) (PLGA) in the same natural bone inorganic/organic composition (75:25)⁶⁻⁸ rendered a porous structure that served as a scaffold for cellular adhesion. We hypothesized that BC composite could serve well in the release of calcium ions and cellular adhesion through the stimulation of the mineralized dentin deposition. Thus, the aim of this study was to observe the histopathological response of pulp tissue after dental pulp-capping using a BC/PLGA composite material.

Materials and Methods

BC/PLGA composite preparation

A 75:25 molar ratio of BC/PLGA composite was prepared using a dual-phase mixing method; the β -Tricalcium phosphate (β -TCP) and (HA) BC (Einc Biomaterial Ltd.[®], Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil) were dispersed in a polymeric biodegradable matrix made from a copolymer of lactic and glycolic acid (PLGA) (MW 60 kDa) (Birmingham Polymers, Inc., Durect Corporation, Pelham, Alabama, USA). The polymer was dissolved in an organic solvent, dichloromethane, and the respective portion of BC was added. In order to remove the maximum amount of solvent residue, the samples were subjected to a

vacuum at 37°C for 24 h.⁷⁻⁸ Samples were sterilized with ethylene oxide and stocked for one week before implantation in the dentin-pulp complex.⁹

Animals

This study was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Minas Gerais (170/2007). The animal model used was chosen in accordance with the protocol for pulp capping for new material evaluation before use on humans to minimize atypical response.¹⁰

Fifty-two non-carious, upper first molars of healthy 4-week-old rats (*Rattus norvegicus*), weighing 250-300 g, were analyzed. The animals were randomly divided into 4 groups to receive a capping agent: Ca(OH)₂ powder mixed with distilled water; BC/PLGA; BC alone; and distilled water as a negative control. The animals were sedated with an intramuscular injection of 10% Ketamine (0.1 ml / 100 g of body weight) (Cetamin[®], Syntec, São Paulo, São Paulo, Brazil) mixed with 10% Xylazine (Anasedam[®], Vetbrands[®], São Paulo, São Paulo, Brazil) at a 2:1 Ketamine to Xylazine v/v. A cavity was prepared on the occlusal phase of the maxillary first molars of each animal. Crown access was made with round carbide burs 1/4 (Maillefer[®], Ballaigues, Orbe, Switzerland) to avoid leakage into the pulp tissue, to standardize cavity access, and to create a future histologic reference point. The procedure was carried out under isolation with a rubber dam and antiseptic treatment with 10% iodine povidone and 70% alcohol. The cavity was accessed using copious sterile water under low rotation with no additional retention. In order to expose the pulp, a final perforation was carefully performed with a steel probe and gently cleaned with cotton buds and distilled water for 2 min. A metal foil interface (stainless platinum, 2 mm diameter) was used to prevent detrimental discharge of ionic mercury contained in the final amalgam restorative material (Velvalloy, S.S. White, Ltd., Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil).¹¹⁻¹²

Histological procedures

At post-operative days 1, 7, 14 and 30, the animals were sedated with an intramuscular injection as described above, sacrificed by cervical traction,

and the maxillary molar specimens were dissected using a scalpel. The specimens were fixed in 10% formalin (Rioquímica®, São Paulo, São Paulo, Brazil) for 48 h at 4°C. Complete demineralization was obtained in 10% EDTA (Sinth®, São Paulo, São Paulo, Brazil) and renewed every 4 d until the corresponding end-point. The tissues were dehydrated in a gradual ethanol series followed by paraffin embedding. Five-micron-thick sections were obtained for Hematoxylin and Eosin (H&E) staining in order to assess the amount of dentin formation and to evaluate the qualitative and quantitative tissue response. Histological analyses were performed by the same single-blind examiner using a light microscope, to count the number of inflammatory cells in 8 different high power (200 X) fields of view according to the following standard histological gradation cri-

teria: (i) Severe: ≥ 250 cells; (ii) Moderate: between 141 to 250 cells; (iii) Slight: between 31 to 140 cells; (iv) No significant or normal response: ≤ to 30 cells.

All statistics were performed using analyses of variance (ANOVAs) (Biostatistic®, Belém, Pará, Brazil). Differences of more than two groups were analyzed by Tukey-test. Statistical significance was defined as $p > 0.05$.

Results

The Inflammatory cells count analysis after pulp capping in each group after 1, 7, 14 and 30 days are shown in Graph 1.

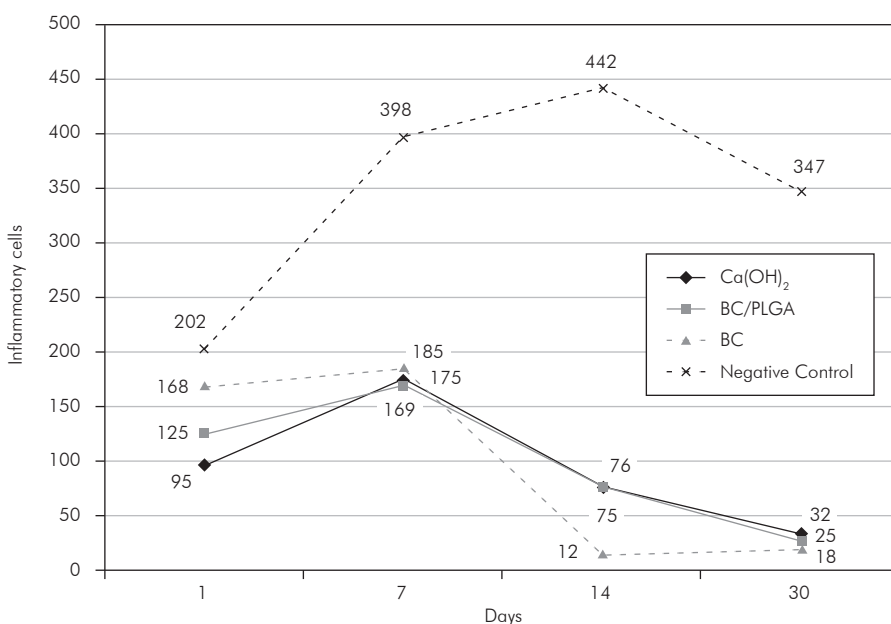
Ca(OH)₂ group

On the first day after pulp capping with Ca(OH)₂, the cavity floor was densely filled by scattered granular structures overlying a proliferation of the normal cellular zone of the pulp (Table 1). A large number of neutrophils, enlarged capillaries, and some macrophages were observed adjacent to the superficial necrotic tissue. The predominant acute infiltrate was slight and degenerative, and necrotic or debris cells were scattered in direct contact with the exposed area. On the 7th day, the inflammatory infiltrate became moderate and was mixed with macrophages, polymorphonuclear cells, fibroblast-like cells, and predominantly enlarged capillaries especially close

Table 1 - Inflammatory cell counts after pulp capping with tested materials observed at four experimental time points.

Groups	Time point			
	1 d	7 d	14 d	30 d
Ca(OH) ₂	95	175*	76*	32
BC/PLGA	125	169	75*	25
BC alone	168*	185	12	18
Negative control	202	398	442	347

* $p > 0.05$ between the Ca(OH)₂ and BC/PLGA groups.



Graph 1 - Inflammatory cell count analysis after pulp capping in each group after 1, 7, 14 and 30 d.

to the $\text{Ca}(\text{OH})_2$ treatment site. There was a significant difference between the more intensive pulp response of teeth treated with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ than those treated with the BC/PLGA composite at post-operative day 7 ($p > 0.05$). On the 14th day, the pulp tissue showed a slight inflammatory infiltrate with lymphocytes, plasma cells, and enlarged capillaries. The exposed area was obstructed by fibrous and mineralized tissue, and in some cases, there was also porosity formation. On the 30th day, there was only a slight presence of inflammatory infiltrate. Dentin formation sufficient to cause complete obstruction after pulp exposition occurred in only 30% of rats in this group. Tertiary dentin, tunnels, fibrous formation and plasma cells were observed adjacent to the exposed site (Figure 1).

BC/PLGA group

Results for days 1, 7, and 14 in the BC/PLGA group were similar to those in the $\text{Ca}(\text{OH})_2$ group.

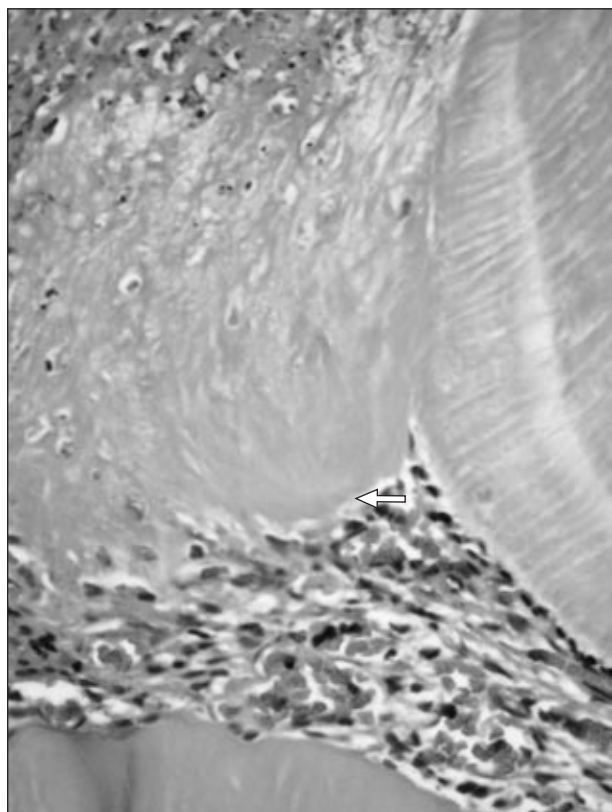


Figure 1 - Hematoxyline & Eosine-stained section of tissue collected 30 d after pulp capping with $\text{Ca}(\text{OH})_2$. A complete calcified bridge was observed (arrow)(40 X).

However, on the 30th day, formation of mineralized tissue (dentinal bridge or osteodentin) was observed with complete filling of the exposed sites in the BC/PLGA group specimens (Figure 2). The inflammatory process was completely resolved by post-operative day 30.

BC group

In the BC group, a large number of neutrophils, fibroblast-like cells, enlarged capillaries, as well as macrophages were observed adjacent to the exposure zone at day 1. The infiltrate presence was generally moderate. After 7 d, pulp tissue was mainly infiltrated by polymorphonuclear cells surrounding the biomaterial. On the 14th day, fibrosis filled the total extension of the pulp chamber, but no infiltrate was observed and there was statistical difference compared to the $\text{Ca}(\text{OH})_2$ group ($p > 0.05$). After 30 d, osteodentin formation was found, but with discontinuous obstruction of the pulp exposure (Figure 3).

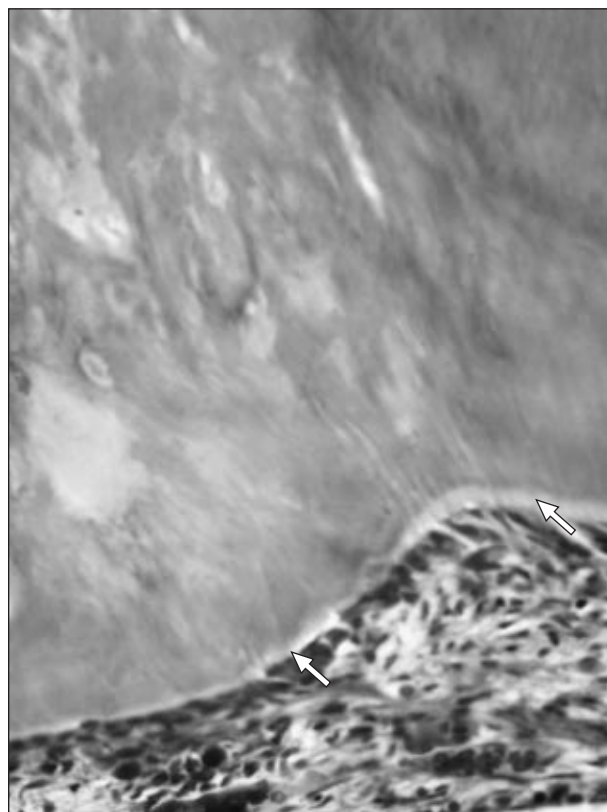


Figure 2 - Hematoxyline & Eosine-stained section of tissue collected 30 d after pulp capping with BC/PLGA composite. A complete calcification bridge was observed (arrows)(40 X).

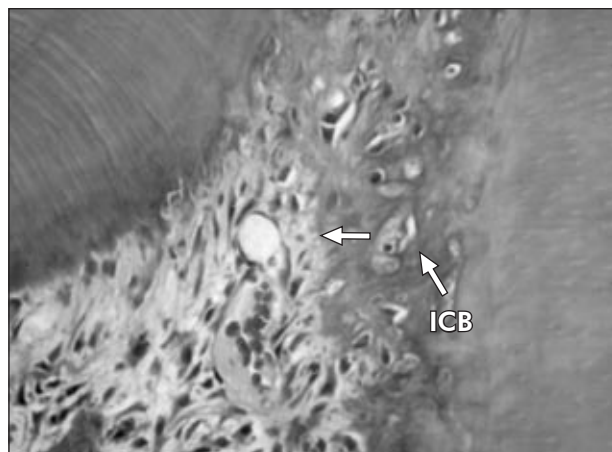


Figure 3 - Hematoxyline & Eosine-stained section of tissue collected 30 d after pulp capping with BC alone. Dense connective tissue (arrow) and incomplete calcified bridge (ICB) were observed (40 X).

The dentin bridge in the BC group was similar to that in the $\text{Ca}(\text{OH})_2$ group.

Negative control group

The inflammatory infiltrate varied from slight to absent in this post-operative period. Post-operative day 1 showed the cavity floor of the negative control group was densely filled with granular structures in which plasma cells were scattered. Superficial necrotic tissue was presented adjacent to the exposed site, and a large number of neutrophils and enlarged capillaries proliferated adjacent to the necrotic tissue. The infiltrate extent was predominantly severe; the necrotic pulp cells and cellular debris were scattered only in the superficial zone of the pulp tissue. On the 7th day, the intense inflammatory infiltration persisted and enlarged capillaries were predominant. Polymorphonuclear cells were found in large numbers, and macrophages and giant cells were also observed. On the 14th day, the inflammatory infiltrate continued severely, with a mixed infiltrate of lymphocytes, plasma cells, and enlarged capillaries. Furthermore, necrosis of the connective tissue was observed in the exposure site. On the 30th day, inflammatory infiltration composed of mononuclear cells remained severe, (Figure 4) nevertheless, there were fewer inflammatory cells than at the earlier time points. While fibrous tissue was observed in two specimens, complete obstruction of the exposed

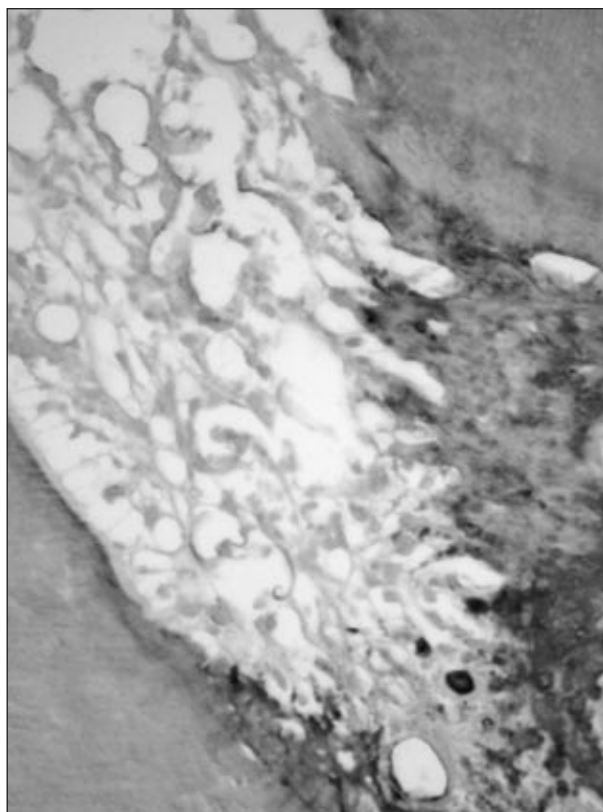


Figure 4 - Hematoxyline & Eosine-stained of tissue collected 30 d after negative control pulp capping. Pulp necrosis was evident (40 X).

site was not detected.

Discussion

Many studies have shown that CaP BCs are highly biocompatible with cells and tissues¹³ and they are therefore recommended for use in the dentin pulp complex.¹⁴ The BC/PLGA has mainly been used as a scaffold, we believe this is most likely due to the biodegradation process of PLGA. The polymer degradation of the most soluble phase of this BC favored growth of pulp tissue adjacent to the exposure site. BC biphasic composition may have acted as a physiological stimulus and anchor for tissue neoformation.¹⁵⁻¹⁶ In the present study, smaller residues in the pulp chamber filled with BC/PLGA were observed relative to that seen with free BC capping 30 d after treatment. These results could be due to the simultaneous hydrolyses of a polymer/ceramic that may have provided a better physiological environment for odontoblasts than polymer or BC.

The crucial effects of HA can be seen in its ability to enhance bone growth, both across a gap and around an implant, in stable and unstable mechanical conditions, additionally, it can facilitate the conversion of the induced fibrous membrane into a bony anchorage.¹⁷ In the BC/PLGA composite group, a fibrous layer formed (after 30 d) which was later supplanted by a newly formed dentin-like tissue. Likewise, this immediate tissue formation can be favored by the properties of these materials, such as cellular adhesion, strong cohesion, and phase stability.¹⁸ Usually after 5-8 weeks in contact with other materials used for direct pulp capping, tissue shows signs of dentin deposition and inflammation reduction.¹⁹⁻²¹ In addition to the presence of some specific inflammatory cells, hydrolytic enzymes also participate in a micro-atmosphere, decreasing the tissue pH, which is important to the process of bone neoformation.¹ Various extents of inflammation were observed within each group in our study.

Since the use of Ca(OH)₂ for direct pulp capping was first introduced, it has been used to improve the inner capability of repairing exposed pulp.²² However, the efficacy of Ca(OH)₂ is limited, especially due to the superficial necrosis and the structure quality of the tertiary dentin.²³⁻²⁵ Histological stud-

ies show that highly mineralized layers of tubular dentin (osteodentin) comprise the reparative dentin. During the differentiation process, the cells show characteristics similar to the fibroblasts of the pulp parenchyma and may be responsible for calcified tissue synthesis.²⁶⁻²⁸ Experiments examining Ca(OH)₂ in animals have resulted in conflicting observations. Some researchers have reported that Ca(OH)₂ was comparable to other materials in terms of its efficacy in supporting pulp healing and repair of dentin bridging.²⁹ Some of the effects of Ca(OH)₂ treatment may include pulp necrosis, apical lesions, and excessive reparative dentin formation,^{22,23,28} whereas others have reported severe inflammation and poor quality, irregular dentin repair.³⁰

Conclusion

The BC/PLGA composite was capable of stimulating pulp tissue reorganization and barrier formation of a mineralized tissue which successfully filled the pulp exposition. The inflammatory infiltrate observed was compatible with a tissue repair process.

Acknowledgements

This investigation was supported by the CNPq, FAPEMIG and CAPES, Brazil.

References

1. Daculsi G, Weiss P, Bouler JM, Gauthier O, Millot F, Aguado E. Biphasic calcium phosphate/hydrosoluble polymer composites: a new concept for bone and dental substitutions biomaterials. *Bone*. 1999 Aug;25(2 Suppl):59S-61S.
2. Briso AL, Rahal V, Mestreneur SR, Dezan Junior E. Biological response of pulps submitted to different capping materials. *Bras Oral Res*. 2006 Jul-Sep;20(3):219-25.
3. Seltzer S. Advances in biology of the human dental pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1971 Sep;32(3): 454-60.
4. Zhang W, Walboomers XF, Jansen JA. The formation of tertiary dentin after pulp capping with a calcium phosphate cement, loaded with PLGA microparticles containing TGF-beta1. *J Biomed Mater Res A*. 2008 May;85(2):439-44.
5. LeGeros RZ. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. [review]. *Chem Rev*. 2008 Nov;108(11): 4742-53.
6. Hasegawa S, Ishii S, Tamura J, Furukawa T, Neo M, Matsusue Y, *et al*. A 5-7 year *in vivo* study of high-strength hydroxyapatite/poly(L-lactide) composite rods for the internal fixation of bone fractures. *Biomaterials*. 2006 Mar;27(8): 1327-32.
7. Ural E, Kesenci K, Fambri L, Migliaresi C, Piskin E. Poly(D, L- lactide/caprolactone)/hydroxyapatite composites. *Biomaterials*. 2000 Nov;21(21): 2147-54.
8. Hench LL. The challenge of orthopaedic materials. *Curr Orthop*. 2000 Jan;14(1):7-15.
9. Mendes GC, Brandão TR, Silva CL. Ethylene oxide sterilization of medical devices: a review. *Am J Infect Control*. 2007 Nov;35(9):574-81.
10. International Organization of Standardization. ISO/TR: 1984: Biological evaluation of dental materials. Geneva: International Organization of Standardization, 1984.
11. Gala-García A, Teixeira KI, Mendes LL, Sobrinho AP, Santos VR, Cortes ME. Effect of Aloe vera on Rat Pulp Tissue. *Pharm Biol* 2008 May;46(5): 302-8.
12. Huggins AH. Medical Implications of dental mercury: a review. *Explore (NY)*. 2007 Mar-Apr;3(2):110-7.
13. Burg KJ, Porter S Kellam, JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2000 Dec;21(23): 2347-59.

14. Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004 Jan;15(1):13-27.
15. Klose D, Siepmann F, Elkharraz K, Siepmann J. PLGA-based delivery systems: Importance of the type of drug and device geometry. *Int J Pharm*. 2008 Apr;354(1-2):95-103.
16. Pataro AL, Oliveira MF, Teixeira KI, Turchetti-Maia RM, Lopes MT, Wykrota FH, *et al*. Polymer: bioceramic composites optimization by tetracycline addition. *Int J Pharm*. 2007 Nov;336(1):75-81.
17. Kitasako Y, Murray PE, Tagami J, Smith AJ. Histomorphometric analysis of dentinal bridge formation and pulpal inflammation. *Quintessence Int*. 2002 Sep; 33(8):600-8.
18. Yildirim OS, Aksakal B, Celik H, Vangolu Y, Okur A. An investigation of the effects of hydroxyapatite coatings on the fixation strength of cortical screws. *Med Eng Phys*. 2005 Apr;27(3):221-8.
19. Heys RJ, Heys DR, Cox CF, Avery JK. The histological effects of composite resin materials on the pulps of monkey teeth. *J Oral Pathol*. 1977 Mar; 6(2): 63-81.
20. Accorinte ML, Loguercio AD, Reis A, Carneiro E, Grande RH, Murata SS, *et al*. Response of human dental pulp capped with MTA and calcium hydroxide powder. *Oper Dent*. 2008 Sep-Oct;33(5):488-95.
21. Shayegan A, Petain M, Vanden Abbeele A. The use of beta-tricalcium phosphate, white MTA, white Portland cement and calcium hydroxide for direct pulp capping of primary pig teeth. *Dent Traumatol*. 2009 Aug; 25(4):413-9.
22. Bergenholtz G, Spångberg L. Controversies in Endodontics. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004 Jan 1;15(2):99-114.
23. Hu CC, Zhang C, Qian Q, Tatum NB. Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. *J Endod*. 1998 Nov;24(11): 744-51.
24. Faraco Jr IM, Holland R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. *Dent Traumatol*. Aug 2001;17(4):163-6.
25. Murray PE, About I, Lumley PJ, Franquin JC, Remusat M, Smith AJ. Human odontoblast cell numbers after dental injury. *J Dent*. 2000 May;28(4):277-85.
26. Stanley HR. Criteria for standardizing and increasing credibility of direct pulp capping studies. *Am J Dent*. 1998 Jan;11 Spec No:S17-34.
27. Olsson H, Petersson K, Rohlin M. Formation of a hard tissue barrier after pulp cappings in humans. A systematic review. *Int Endod J*. 2006 Jun;39(6):429-42.
28. Turner C, Courts FJ, Stanley HR. A histological comparison of direct pulp capping agents in primary canines. *ASDC J Dent Child*. 1987 Nov-Dec; 54(6):423- 8.
29. Cox CF, Heys DR, Gibbons PK, Avery JK, Heys RJ. The effect of various restorative materials on the microhardness of reparative dentin. *J Dent Res*. 1980 Feb;59(2):109-15.
30. Hayashi Y, Imai M, Yanagiguchi K, Vilorio IL, Ikeda T. Hydroxyapatite applied as direct pulp capping medicine substitutes for osteodentin. *J Endod*. 1999 Apr; 25(4): 225-9.

Use of calcium phosphate/poly(lactic-co-glycolic acid) composite in direct pulp capping in vivo and cell biocompatibility.

Gala-García A, Carneiro MBH, Ferreira LS, Silva GAB, Vieira LQ, Marques MM, Sinisterra RD, Cortes ME.

Alfonso Gala-García - Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Brazil.

Matheus Batista Heitor Carneiro - Science Biological Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

Leila Soares Ferreira - Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Universidade de São Paulo (USP). Brazil.

Gerluza Aparecida Borges Silva – Science Biological Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

Leda Quercia Vieira - Science Biological Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

Márcia Martins Marques - Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Universidade de São Paulo (USP). Brazil.

Rubén Darío Sinisterra - Chemistry Department, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil.

María Esperanza Cortés - Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Brazil.

* Corresponding author at:

Faculdade de Odontologia, UFMG

Av. Antonio Carlos, 6627, Pampulha

31.270-901 Belo Horizonte, MG Brazil

Phone:55-31-34092437 fax: 55-31-3409-2430

e-mail: mecortes@ufmg.br

Abstract

The aim of this study was to assess the cell viability of bioceramic (BC) and poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) composite (BC/PLGA) in macrophages, human dental pulp fibroblasts (FP5) culture and to evaluate the rat dental pulp after direct capping pulp. There was progressive fibroblast growth in all experimental groups in a similar form among the groups. The histological evaluation of inflammatory infiltrate and dentinal bridge formation after 60 d were evaluated. Scores were established for the hard tissue formation, general state of pulp and inflammatory response level. *In vivo* study showed that BC/PLGA composite, BC or $\text{Ca}(\text{OH})_2$ had presence of dentinal bridge been that composite was the most prevalent (90%) reached the best scores after 60 d. Mild to moderate inflammatory response was the most prevalent general state of the pulp after 30 days. Moreover, necrosis was more prevalent after 60 days in both of groups. The results obtained of reparative dentine bridge verified after pulp capping after 60 days with the experimental materials *in vivo* were possibly due to the chosen model. In conclusion, the BC/PLGA composite is biocompatible with human fibroblasts and peritoneal macrophages and direct pulp capping had the best tissue response when compare with $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

Keywords: calcium phosphate, poly (lactic-co-glycolic acid), dental pulp capping, fibroblasts, macrophages, cellular viability, hard tissue bridge,

INTRODUCTION

During routine clinical dentistry procedures, it is possible to expose the pulp tissue and proceed to pulp capping to preserve pulp vitality and promote healing and function. Numerous factors may influence the healing process of the dental pulp, including the condition of the pulp itself, the restorative material manipulation, the applied capping material, and so forth. The most commonly used materials for dental pulp capping are various forms of calcium hydroxide by their odontogenic effect (1). The application of calcium hydroxide is a treatment option to encourage hard tissue bridging after dental pulp capping. However, this material is not considered ideal because it is not able to really induce new tissue formation in most cases. Other materials such as dentin adhesives, hydroxyapatite, mineral trioxide aggregate, tricalcium phosphate, allogenic dentin matrix, bone morphogenetic protein (BMP) and calcium hydroxide cements have been studied with regard to hard tissue barrier formation after pulp exposure (2,3). It has been suggested that tissue engineering techniques can offer a solution for this problem (4). One approach is the development of a conductive scaffold to induce the resident cells in the dental pulp to regenerate the new tooth tissue.

Calcium phosphate-based bone substitute materials in different forms (granules, blocks, composites) or as cements or coatings on orthopedic and dental implants are used in many medical and dental applications. Moreover, they could be used as scaffolds in tissue engineering for dentin or bone regeneration. Calcium phosphates (CaP) are similar to bone in composition and having bioactive (ability to directly bond to bone, thus forming a uniquely strong interface) and osteoconductive (ability to serve as a model or guide for the newly forming bone) properties. Interconnecting porosity (macro porosity and micro porosity) similar to that of bone can be introduced by

chemical or physical methods. The bioactive property promotes formation of a carbonate hydroxyapatite layer, which attracts protein to which cells bind or adhere, proliferate, and differentiate, leading to matrix production and biomineralization or formation of new bone (5).

Tricalcium phosphate (TCP) is a porous bioceramic material and it has biological properties as non-reactivity and resorbability. It can serve as scaffolding for bone ingrowths, as it progressively degrades and is replaced by bone. Both the alpha and beta types of TCP have been shown to play important roles in bone grafting procedures. Physical investigations using density functional calculations suggest that beta-TCP is more stable than alpha-TCP (6). Because of its osteoconductivity and bone replacement capability, TPC is highly promising for use in numerous dental and craniofacial procedures, including the reconstruction of frontal sinus cavities. In theory, the biocompatibility of TCP combined with calcium release may allow TCP to stimulate odontoblasts, thus promoting the formation of dentin bridges. TCP also seems to promote bone regeneration (7) or was able to trigger resident stem cells in the pulp to differentiate into odontoblast-like cells and to induce the formation of tertiary dentin (8).

Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) is a copolymer composed of one or more of three different monomers, L-lactic, and/or glycolic acids. The polymer, can be made to be highly crystalline, is a biodegradable polymer that has been approved by the FDA and has been widely investigated for its applicability in drug delivery applications (9, 10).

In a preliminary study of direct capping pulp with bioceramic dispersed in a poly (lactic-co-glycolic acid) polymer (BC/PLGA) was demonstrated that the BC/PLGA composite was capable of stimulating pulp tissue reorganization and barrier formation of a mineralized tissue which successfully filled the pulp exposition and the

inflammatory infiltrate of the pulp tissue observed was compatible with a tissue repair process after 30 days (11).

In the present study, it was hypothesized that the biological properties of the β -tricalcium phosphate-hydroxyapatite bioceramic (BC) optimized by poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA), can be further a better material (BC/PLGA) after pulp capping after 60d. Additionally, the biocompatibility of pulp cells (macrophages and fibroblasts) could result an effective pulp responses can act as vehicles for the delivery of signal molecules that stimulate the differentiation of innates pulp cells into odontoblasts-like, resulting in a biological regeneration through enhanced tertiary dentin formation.

The aim of present study was to asses the cells biocompatibility in contact with Bioceramic/Poly (lactic-co-glycolic acid) composite (BC/PLGA) of peritoneal macrophages, human fibroblasts cultures and subsequently, histological evaluation of rat dental pulp after direct pulp capping after 30 and 60 days.

MATERIALS AND METHODS

MATERIALS

The β -tricalcium phosphate (β -TCP) and hydroxyapatite (HA) (Osteosynt ®) was gently donated by Einco Biomaterial®, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; the polylactic and glycolic acid polymer, MW 60 kDa was obtained from Birmingham Polymers, Inc., Durect Corporation, Pelham, Alabama, USA. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-F12) and RPMI medium 1640 were obtained from Sigma Chemical, St. Lois, MO; MTT reduction analysis kit (Vybrant MTT, Molecular Probes, Eugene, OR).

BC/PLGA composite preparation

The composite was prepared as previously related by Gala-García, *et al.*, 2010 (11). Briefly, the BC/PLGA composite was prepared using the dual-phase mixing method. It was mixture two suspensions of bioceramic with polymeric phase dissolved in an organic solvent, dichloromethane, and mechanically stirred for 4 h (12-13). After the complete solvent evaporation the suspension was placed in a glass mould to form a tube, and cutted in slides of 2mm x 5mm. The samples were sterilized with ethylene oxide and stocked for one week before implantation in the dentin-pulp complex (14). The morphology of BC/PLGA was evaluated by Scanning Electron Microscope in Jeol JSM 6360 (Tokyo-Japan).

Cells cultures

Human pulpal fibroblasts (FP5 cell line) derived from a human third molar germ and were grown in DMEM-F12, supplemented by 10% (SFB) and 1% antibiotic–antimycotic solution (10 000 units of penicillin, 10 mg of streptomycin and 25 µg/mL of amphotericin B in 0.9% sodium chloride; Sigma) in a humidified air–5% CO² atmosphere at 37°C. Cells were used at the fifth and 6th passages in all experimental procedures (15).

Peritoneal inflammatory macrophages (primary culture) were obtained from female mice, C57BL/6, with age of 6 - 8 weeks, from CEBIO (UFMG, Belo Horizonte, Brazil) and kept in a conventional animal house facility with environmental barriers. The peritoneal cavity was injected with 2 mL of 3% thioglicolate medium, containing 1% sterile agar. Three days after injection, the animals were killed by decapitation and 10 ml of sterile PBS were injected into the peritoneal cavity using a syringe and an 18-gauge needle. Cells were recovered from the peritoneal cavity by aspirating back the PBS containing the inflammatory cells. Immediately were placed into 300 µL of RPMI medium, containing 10% SBF, 2mM of L-glutamine and 100 units/mL of

penicillin and 100µg/mL of streptomycin and cultivated (2×10^5 cells/wells) at 5% CO₂ humidified atmosphere and 37°C (16).

MTT-based cytotoxicity assay

The experimental cells groups were: Control (cells in culture medium), BC/PLGA composite + Cell culture medium, bioceramic (Osteosynt®) + cell culture medium and polymer PLGA + Cell culture medium. In order to obtain the conditioned media for each material (BC/PLGA, BC and PLGA groups) were used 0.2 g /ml of fresh medium DMEM-F12 for fibroblasts and RPMI for macrophages, according to the American Society for Testing and Materials (17). These samples had direct contact with the materials for 1 h allowing release or dissolution of substances during this procedure (15).

The FP5 cells were plated into 96-well microtitration plates (5×10^2 cells/well). After 4h, the cells received conditioned medium to each experimental group. Conditioning was carried out for 1 h, at 37°C, in humid atmosphere with 5% of CO₂. After this period, the conditioned medium of all groups were substituted for fresh medium. Cell mitochondrial activity was analyzed using the MTT based cytotoxicity assay at 2, 24 and 48 h after the conditioning, for each experimental group. Immediately after the end of the assay procedures the absorbance was read in a micro plate reader (Biotrak II, Biochrom Ltd., Eugendorf, Austria) using a 562 nm filter. All the experiments were done in triplicates. Cell growth curves were then plotted and the absorbance data were transformed into percentage of viable cells.

The MP were plated into 96-well (2×10^5 cells/well), cell mitochondrial activity was analyzed using the MTT assay after 48 hours after the conditioning, for each experimental group. Immediately after the end of the assay procedures the absorbance was read in a micro plate reader using a 562 nm filter. The scores

obtained from replicates of FP5 or MP cellular group were compared by ANOVA complemented by Tukey test.

Cellular adhesion evaluation

The cell concentration was of 1×10^4 / mL for FMM1 and 1×10^5 / mL for MP. Carefully, with the pipette was placed 1 ml of medium were placed on BC/PLGA composite discs and control group in triplicate. The morfological analysis was performed by SEM.

Evaluations of pulp response *in vivo*

This study follow the same protocol described elsewhere (11,18). The research was approved by the institutional Ethics Committee for Animal Research. Healthy 4-week-old male rats (*Rattus norvergicus*), weighing 250-300 g were used to access the upper non-carious first molars (n=20/group). The animals were randomly divided into 4 groups to receive a capping agent: BC/PLGA composite, BC, or Ca(OH)_2 powder mixed with distilled water and PLGA group (n=10).

In order to obtain more specific information in the present study, the histologics evaluation used the following protocol: slides were blindly evaluated by one calibrated examinador according to the criteria described in Table 1, each histomorphologic event of hard bridge tissue and dental pulp tissue were evaluated in a 1-4 score system, with 1 being the best result and 4 the worst result. The statistical analysis of scores attributed to each group was performed using the software Statistical Package for Social Sciences (version 15.0 for Windows, SPSS Inc., USA) and descriptive analysis and for Qui-square and Fisher Exact Test.

TABLE 1. Scores used during histological exams: hard tissue bridge and inflammatory response used to histological exams of dental pulp.

Scores	Hard tissue
1	Presence
4	Absence
Scores	Continuity
1	Complete
2	Little communication of the capping material with dental pulp
3	Only lateral deposition of hard tissue on the walls of the cavity of pulp exposition
4	Absence of hard tissue bridge and absence of lateral deposition of hard tissue
Scores	Morphology
1	Dentin or dentin associated an irregular hard tissue
2	Only irregular hard tissue deposition
3	Only a slight layer of hard tissue deposition
4	No hard tissue deposition
Scores	Localization
1	Closure to the exposition area without invading the pulp space
2	Bridge invading pulp space next to the opposite dentin wall
3	Bridge reached the opposite dentin wall
4	No bridge or only hard tissue deposition on the walls of the exposition cavity

TABLE 2. Percentage of scores attributed for each group in each criterion of hard tissue bridge

Scores	Inflammatory reaction
1	Absent
2	Mild: inflammatory cells only next to dentin bridge or area of pulp exposition
3	Moderate: inflammatory cells are observed in part of coronal pulp
4	Severe: all coronal pulp is infiltrated or necrotic
Scores	General state of the pulp
1	No inflammatory reaction
2	With inflammatory reaction
3	Abscess
4	Necrosis

Results

SEM micrographs of BC/PLGA composite are shown on Fig. 1. The powder is entirely irregular in shape and possesses a sharp surface, heterogeneous mixture of bioceramic and polymer materials and presence of pores of 30-50 micrometres, approximately. The pores are open; however bare interconnected, nonhomogenous network with low porosity was noted.

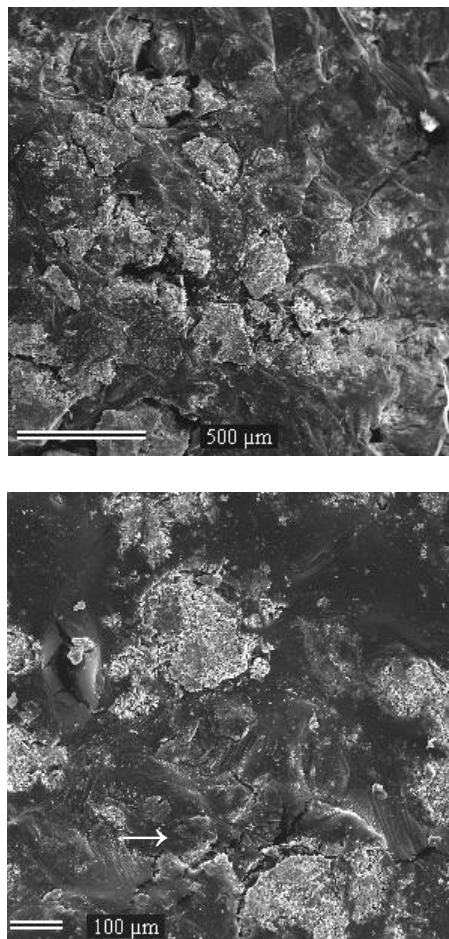


Figure 1. Scanning electron micrographs of BC/PLGA composite disc surface showing an irregular topography (A) and presence of pores.

MTT-based cytotoxicity assay

The results of the cytotoxicity assay of the different materials: composite, bioceramic or PLGA evaluated on human pulp fibroblasts (FP5) are present in Fig. 2 (A). There was a progressive cell proliferation in all experimental groups similar to the control group at each experimental time (1 or 24). After 48 h only the composite group had fewer cells proliferation when compared to control group, however, demonstrated an increasing profile when compared to composite after 24 h, and was similar with the other groups BC or PLGA.

The macrophages viability remained at 100% when in contact with the composite (Fig.2 B), bioceramic and/or polymer PLGA. All groups showed the similar behavior in relation to metabolism of MTT ($p \geq 0.05$). (ANOVA complemented by Tukey test). The fibroblasts and peritoneal macrophages showed excellent cellular adhesion and distribution on BC/PLGA discs composite are shown on Fig. 3 A and B, respectively. There were many cells adhered and distributed uniformly on the BC/PLGA composite discs surface, exhibiting well-defined cytoplasmic extensions that projected from the cells to the surrounding surface or adjacent cells.

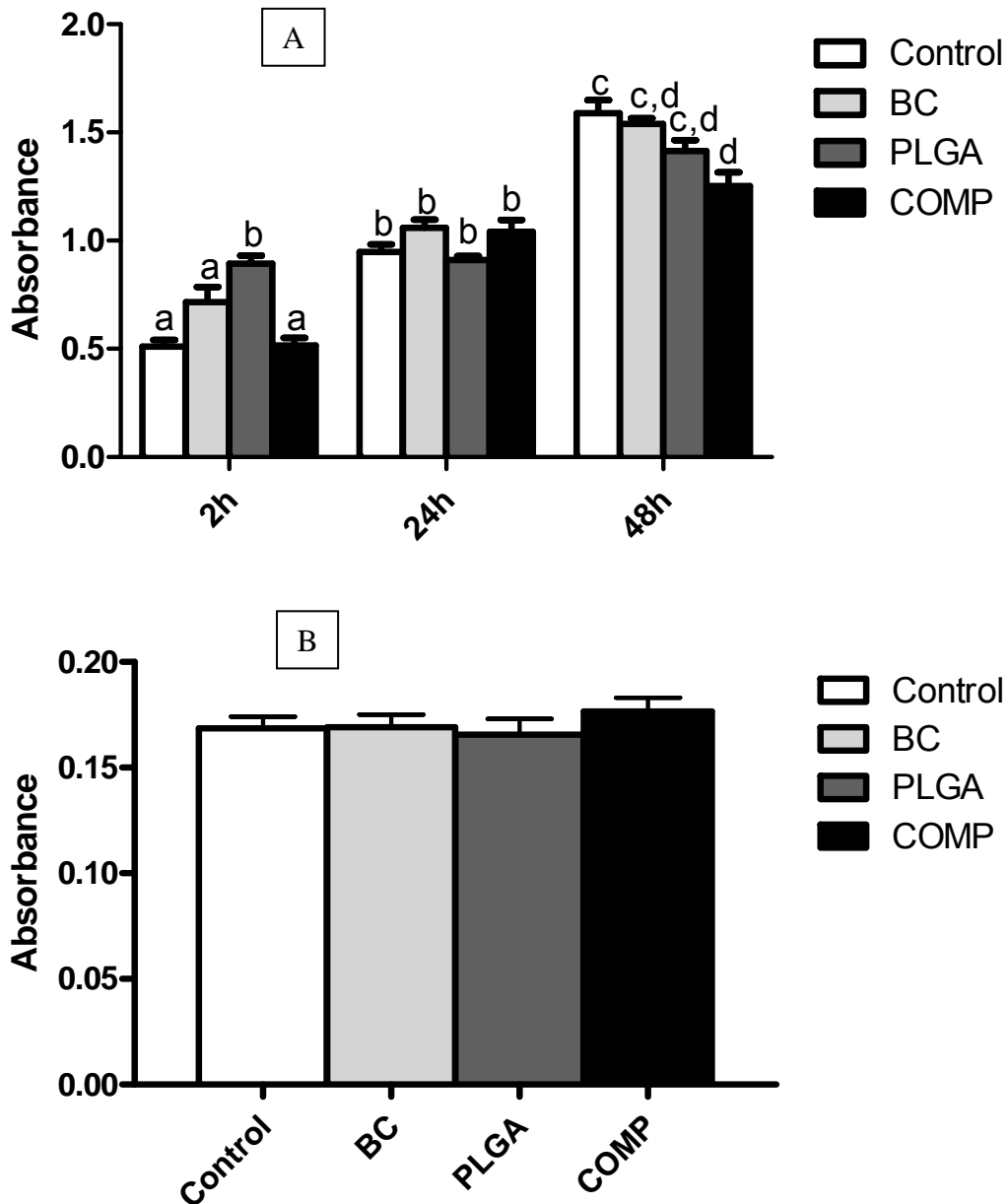


Figure 2. Cellular viability of human pulp fibroblasts culture after contact with control, bioceramic, PLGA and BC/PLGA composite (COMP)2; 24 and 48h(A); and viability of peritoneal macrophages after 48 h of contact with control, bioceramic, PLGA or BC/PLGA composite (COMP).

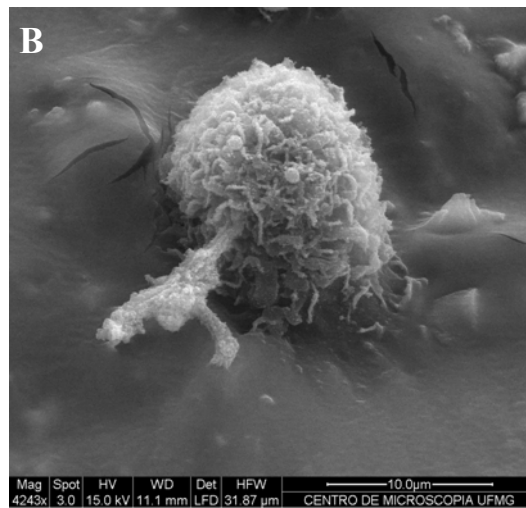


Figure 3. SEM of BC/PLGA composite surface showed the presence human gingival fibroblasts adhesion after 24 h (arrows) (A) 4300X and peritoneal macrophages peritoneal macrophage cell (B) 4000X.

***In vivo* pulp capping test after 30 days**

The results after pulp capping in BC/PLGA 30 group showed 90% of the specimens exhibited presence of complete bridge invading pulp space next to the opposite dentin wall and dentinal associated and irregular tissue ly hard tissue (Fig. 4A) and in 60% of the cases the hard tissue bridges were partial. Different inflammatory intensities were observed on the specimens (scores 2 and 3), absent inflammation was noted in 30% (Fig. 4B). No hard tissue was observed with pulp necrosis in 10% of the cases.

In the BC30 group after pulp capping 50% of the specimens exhibited complete hard tissue, 10% completely hard tissue bridge invading pulp space and only irregular hard tissue deposition (Fig. 4C) and 30% of the cases showed partial hard tissue bridges. Different inflammatories intensities were observed of the specimens, absent inflammation in 10%, mild in 20% (Fig. 4D) and moderate in 20%. Absence of hard tissue bridges and pulp necrosis or abscess was observed in 40% of cases.

In PLGA Group 30, ninety percent of the specimens exhibited hard partial tissue bridges invading pulp space (scores 2 and 3) next of the opposite dentin wall and irregular hard tissue deposition (Fig. 4E). The presence of inflammation was 20% mild to moderate (Fig. 4F). When analyzed continuity 90% of the cases had hard tissue bridges (score of morphology 1 plus 2) and pulp necrosis was noted in 10% (score 4).

In the CaOH 30 group after pulp capping 85% of the specimens exhibited presence of dentin bridge, which 20% of showed complete tissue bridge formation closures the exposition area invading the pulp space with irregular dentin (score 1 of continuity) (Fig. 4G) and partial bridge formation was observed in 65%. In these cases, absent inflammation was observed in 20%, mild in 40% (Fig. 4H) and moderate in 25%. No hard tissue bridge and pulp necrosis were observed in 15% of the cases (score 4).

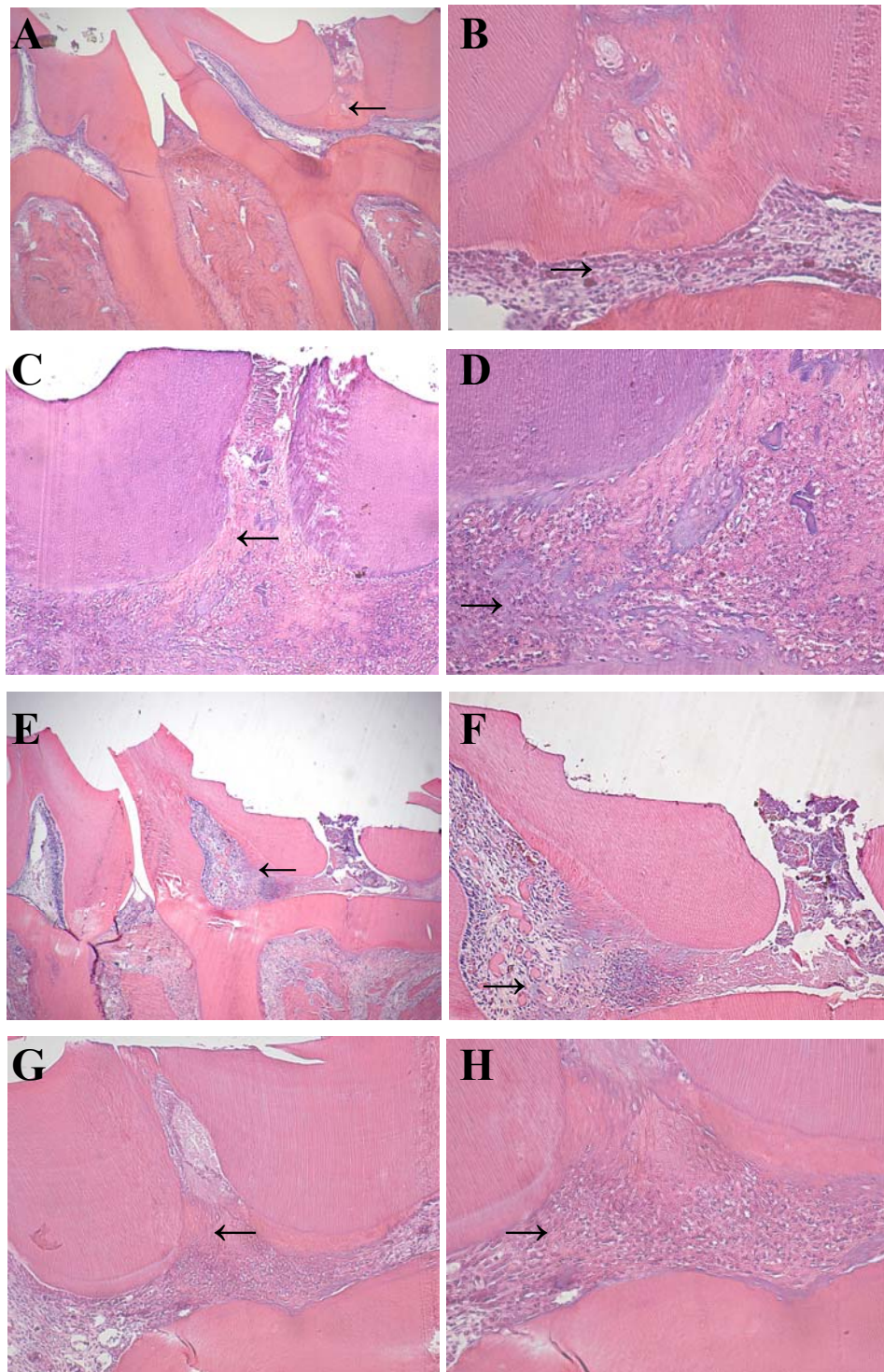


Figure 4. Light micrographs of pulp dental tissue after 30 days pulp capping with: BC/PLGA complete hard tissue bridges (A) (4X) and normal pulp tissue (B) (20X); BC complete hard tissue bridge (C) (10X) and mild pulp inflammation (D) (20X); PLGA: incomplete hard tissue bridge (E) (4X) and moderate pulp tissue inflammation (F) (10X); CaOH_2 : complete hard tissue bridge (G) (10X) and mild pulp inflammation(H) (20X), (H&E).

***In vivo* pulp capping test after 60 days**

In BC/PLGA 60 days, the 60% of the specimens showed dentin bridge with diverse continuity scores, been 15% complete hard tissue bridges invading pulp space and irregular dentin tissue (score 1)(Fig. 5 I). In 60% of the cases the hard tissue bridges were partial (scores 2 and 3 of localization). A presence of inflammation was classified as absent in 25% (Fig. 5J), mild in 20% and moderate in 15%. In 40% of the specimens with pulp necrosis no hard tissue bridge was observed.

The results of BC 60 presented, 20% of the specimens exhibited hard tissue bridge been 10% were invading the pulp space with only 10% irregular hard tissue deposition (Fig. 5K). A presence of inflammation was classified as mild in 10% and moderate in 10% (Fig. 5L). No hard tissue bridge was observed in 80% of the specimens and pulp necrosis or abscesses were evident.

In the PLGA60 group no hard tissue bridge was observed in all cases (Fig. 5M) and the pulp necrosis was evident (Fig. 5N). This fact is possible due to the low adhesion of this material although the high biocompatibility shown in the cellular tests.

Finally, teeth capping with CaOH shown that there was bridge formation in 85% of the cases been that 20% percent of the specimens showed hard tissue bridges invading pulp space next the dentinal wall with irregular dentin (Fig 5 O). In 40% of the samples was showed bridge the opposite dentin wall. The inflammation were classified in absent in 20%, mild in 10% and moderate (Fig 5P) in 30% of samples. No hard tissue bridge and pulp necrosis was observed in 40% of cases.

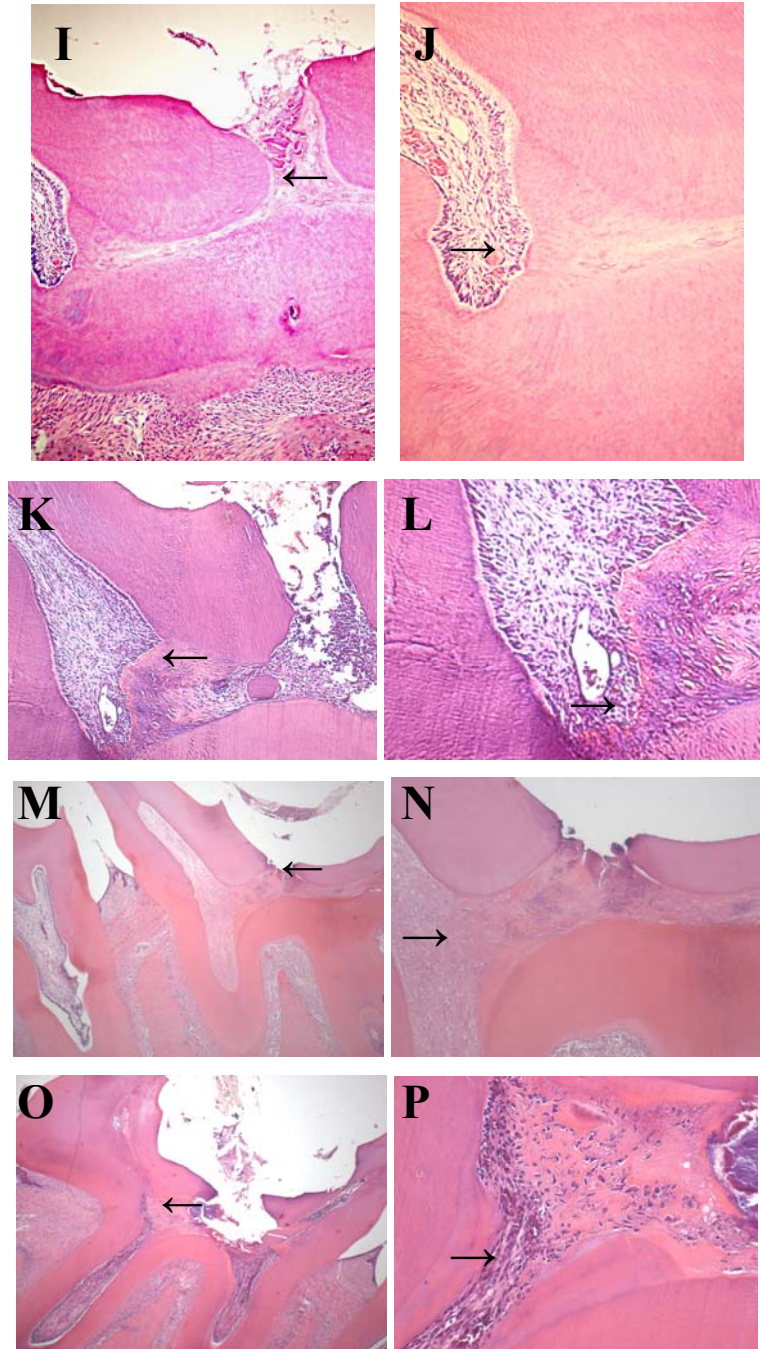


Figure 5. Light micrographs of pulp dental tissue after 60 days pulp capping with: BC/PLGA: complete hard tissue bridges (I) (10X), normal pulp tissue (J) (20X); BC incomplete dentine bridge (K) (10X), moderate pulp inflammation(L) (20X); PLGA: (M) absence dentin bridges (4X), (N) pulp necrosis (10X) and CaOH group: complete hard tissue bridges (O) (4X), moderate pulp inflammation(P) (20X), (H&E).

Histomorphologic features

The percentage of scores for each group is shown in Tables 2 and 3. All groups performed well in terms of hard tissue formation and pulpar response. However, superior responses of groups BC/PLGA 30 and CaOH 30 were observed for the hard tissue bridge formation, when compared with BC/PLGA 60 and BC 60 groups respectively ($p < 0.05$). Similar p value were obtained in the BC/PLGA 30 and 60 d when compare with CaOH 30 and 60 groups, respectively in relation with hard tissue localization and hard tissue continuity (Table 3). In terms of dental pulp reaction showed no statistically significant difference ($p > 0.05$).

Table 3. Percentage of scores attributed after pulp capping of teeth treated with BC/PLGA composite, BC, PLGA or Ca(OH)₂ related with the general state of pulp and Inflammatory Reaction Degree.

Groups	Presence		Localization				Continuity				Morphology			
	1	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
BC/PLGA30	90*	10	-	40	10	10	30	60	-	10*	35	55	-	10
BC/PLGA60	60	40	-	25	35	40	15	20	25	40	15	35	10	40
BC30	50*	50	-	20	30	50	10	10	30	50	-	50	-	50
BC60	20	80	-	10	10	80	-	10	10	80	-	10	10	80
PLGA30	20	80	-	20	-	80	-	20	-	30	-	20	-	80
PLGA60	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100
Ca OH30	85	15	15	55	15	15*	20	65	-	15	-	85	-	15
Ca OH60	60	40	-	20	40	40	-	60	-	40	-	60	-	40

* $p < 0.05$ when compared 30 with 60 in the same group.

Groups	General State of Pulp				Inflammatory Reaction Degree			
	1 No Inflammation	2 Inflammation	3 Abscess	4 Necrosis	1 Absent	2 Mild	3 Moderate	4 Severe
BC/PLGA 30	30	60	-	10	30	40	20	10
BC/PLGA 60	25	35	-	40	25	20	15	40
BC 30	10	40	10	40	10	20	20	50
BC 60	-	20	15	65	-	10	10	80
PLGA 30	-	20	-	80	-	10	10	80
PLGA 60	-	-	-	100	-	-	-	100
CaOH 30	20	65	-	15	20	40	25	15
CaOH 60	20	40	-	40	20	10	30	40

DISCUSSION

Ideally, pulp capping materials should be biocompatible, of low toxicity and capable of promote mineralization. This study was designed to evaluated the effect of bioceramic (BC) / poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) composite (BC/PLGA) on the viability of human fibroblasts and peritoneal macrofages cell culture and the responses of dentine-pulp complex tissue after pulp-capping. The similar cell viability demonstrated of the human fibroblasts and peritoneal macrophages culture in contact with BC/PLGA materials observed this study can be explained by the biocompatibility of both constituents of the composite material. The the biphasic bioceramics (tricalcium phosphate and hydroxyapatite) are used to induce the formation of mineralized bone tissue and in surgery for bone reconstruction (19- 20). The results founded are in concordance with studies of cell viability of human pulp fibroblasts culture of hydroxyapatite powder (21) and hydroxyapatite particles (22). Contrariouly, cytotoxicity was not observed on pulp fibroblasts culture in contact with biphasic calcium phosphate/poly-dl-lactide-co-glycolide biocomposites (23) or in

dental cell culture seeded them onto biodegradable polymer scaffolds (24). The interaction of cell/polymer constructs implanted into a suitable host such that a sufficient fluids supply could support the growth of higher-ordered structures (25). Also, it has been reported that human pulp fibroblasts culture with other materials for pulp capping in medium conditioned with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ cement did not decrease the number of cells and the portland cement on pulp cell culture is not cytotoxic (26).

In our study the pulp inflammation after pulp capping observed was compatible with tissue repair process and the dentin tissue formation was evident. During of pulp capping process, the deposition of collagen in remarkable amount because the inflammatory microenvironment; the collagen synthesis by fibroblasts during the inflammatory process is a key event for human pulp repair (27). Frequently, the importance of inflammation in pulp healing has been underestimated, considered only to be an undesirable effect, leading in most case to pulp necrosis. Currently know it on the inflammatory process have a potentially beneficial effect of this process, understanding better the initial molecular and cellular events leading to pulp repair and development of ideal materials to promote pulp healing (28). In contrast, others studies showed decreased or inhibition of human fibroblasts culture in contact com HA/ β -TCP particles (60% HA / β -TCP 40%) after 72 h, was observed decreasing of cell viability with the increase of particles concentration HA/ β -TCP (29). Similar results were obtained when evaluated cytotoxicity of cultured human fibroblasts were exposed to various types of ceramic powders such as HA or TCP at different concentrations, it was observed inhibition of cell viability in 50% of group tricalcium phosphate group (30).

The cell adhesion of human fibroblasts and peritoneal macrophages on BC/PLGA composite discs observed by scanning electron microscopy (SEM) may be related to the effect of biphasic calcium phosphate material of cells. The studies about

macrophage adhesion in literature suggested the effect of biphasic bioceramic, after overnight incubation, secreting particles and creating a transition zone that allows further macrophage adhesion (31). It is known that during the pulp inflammatory process, immunocompetent cells are attracted to the site in an attempt to eliminate the aggressor stimulus. Macrophages are among the first cells to come in contact with foreign bodies and play the main role in the pathogenesis of the inflammatory process(32) and the periapical inflammatory (33- 35).

The preservation of cytoplasmic extensions is important, because these extensions form a three-dimensional network within hard tissue and materials (16, 31, 36- 38). The factors that affect cellular response to calcium phosphates include surface topography (roughness), composition and particle size. The mechanism of action after material placement is, initially the cell phagocytose the calcium phosphate particles, causing them to biodegrade *in vitro* and *in vivo*. *In vitro* it was capable to promote collagen production and phenotypic expression of proteoglycans and matrix proteins associated with mineralization (39-41). Studies in similar model with fibroblasts culture, during overnight incubations, human pulp fibroblasts were able to adhere, spread, and remain viable on BC/PLGA composite discs, as was evidenced by using SEM (23). Also was observed cell viability of human pulp cells on Portland cement for 24 hs, the material surface exhibited well-defined cytoplasmic extensions that projected from the cells to the surrounding surface or adjacent cells. This fact is important because the cell adhesion is a complex and dynamic process that plays a critical role in wound healing and has implications in cell growth, proliferation and differentiation.

The importance of maintaining the vitality of the dental pulp after pulp capping followed by formation of dentin bridge is widely accepted. The pulp vitality and mild inflammation observed in our study, especially in BC/PLGA and Ca(OH)₂ groups,

were compatibles with tissue repair process and the dentin bridge formation after pulp capping agree with others studies (8, 11) where the vital pulp capping is known to have a very variable prognosis.

The presence of dentine bridge observed in BC/PLGA group was, in average, above 90% and 85% to CaOH₂ group consistent with findings in the literature (8, 11). The important effect of HA on bone formation is the mechanism by which the regeneration of dentin tissue can happen. Theoretically, the non-reactivity, the resorbability and biocompatibility combined with calcium release of TCP can stimulate odontoblasts, thus promoting the formation of dentin bridges. Studies about direct pulp capping with ceramic of tricalcium phosphate seemed to provide the best reparative dentinogenetic effect, resulting in a thicker reparative, dentin bridge of quicker formation of normal tubular dentin. Using particles of calcium phosphate ceramics and hydroxyapatite after direct capping in amputated pulp showed hard tissue barrier presence with two types of tissue structure, osteodentin and tubular dentin, located around the particles of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate.

The advantages of the materials based on hydroxyapatite and / or tricalcium phosphate in the capping pulp direct can include the following, the physiological pH, the absence of necrotic tissue in the adjacent dental pulp and denser dentin bridge.

In a preliminary study (18) was assessed the presence of dentine bridge found that over 90% of the samples of BC/PLGA group showed the presence of dentine bridge and the inflammation has been resolved after 30 days. The important effects of HA and the β -TCP can be seen in its ability to enhance bone growth, both across a gap and around an implant. It was observed the presence of fibrous layer formed after 30 days which was later supplanted by a newly formed dentin-like tissue. Likewise, this immediate tissue formation can be favored by the properties of these materials (11). Similarly, during bone regeneration after injury, the inflammatory phase is followed by

a reparative phase, characterized by the formation of a hard callus that occurs when the matrix mineralizes (37). As the processes of bone and tooth mineralization are similar, and can be recommended for use in the dentine pulp complex.

In most clinical scenarios, the pulp exposure frequently occurs by a traumatic or carious process in which the level of inflammation is much higher. However, although the use of vital healthy teeth for this kind of study has limitations, it still has the benefit of standardization and can be regarded as acceptable in respect to material selection and handling. The histologic feature of this study suggests the fact that BC/PLGA can be safely used for pulpal capping of human teeth. BC/PLGA seemed to heal the pulp tissue at a faster rate than $\text{Ca}(\text{OH})_2$ cement, although after 60 days both materials reached similar and excellent results for pulp capping. Moreover, necrosis was more prevalent after 60 days in both groups. The lack results obtained of reparative dentine bridge verified after pulp capping with the experimental materials *in vivo* was possibly due to the chosen model.

CONCLUSION

Under the experimental conditions of this study it is possible to conclude that, the bioceramic BC/PLGA composite is biocompatible with the human fibroblasts and the peritoneal macrophages. Moreover, the data obtained in this study suggest that BC/PLGA composite is a good material with a possible use as direct pulp capping agent. Further investigations on other *in vitro* and *in vivo* experimental models are under way with hope that it can provide some promising biologically active formulation.

REFERENCES

- 1 Olsson H, Petersson K, Rohlin M. Formation of hard tissue barrier after pulp capping in humans: A systematic review. *Int Endod J* 2006; 39:429-442.
- 2 Briso AL, Rahal V, Mestrener SR, Dezan Junior E. Biological response of pulps submitted to different capping materials. *Braz Oral Res* 2006; 20:219-225.
- 3 Seltzer S. Advances in biology of the human dental pulp. *Oral Sur Oral Med Oral Pathol* 1971; 32:454-460.
- 4 Nor JE. Tooth regeneration in operative dentistry. *Oper Dent* 2006; 31:633-642.
- 5 LeGeros RZ. Calcium phosphate-based osteoinductive materials: Review. *Chem Rev* 2008; 108:4742-4753.
- 6 Yin X, Stott MJ, Rubio A. Alpha and beta-tricalcium phosphate: a density functional study. *Phys Rev B* 2003; 68:205-220.
- 7 Elahi MM, Vanduzer S, Spears J, Gibson J, Mitra A. Frontal sinus obliteration with beta-tricalcium phosphate. *J Craniofac Surg* 2004; 15:967-970.
- 8 Zhang W, Walboomers XF, Jansen JA. The formation of tertiary dentin after pulp capping with calcium phosphate cement loaded with PLGA microparticles containing TGF-beta1. *J Biomed Mater Res A* 2008; 85:439-444.
- 9 Bhatnagar R, Li S. Biomimetic scaffolds for tissue engineering. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2004; 7:5021-5023.
- 10 Thomson RC, Wake MC, Yaszemski MJ, Mikos AG. Biodegradable Polymer Scaffolds to Regenerate Organs. *Adv Polym Sci* 1995;122:245-274.
- 11 Gala-Garcia A, Teixeira KIR, Wykrota FHL, Sinisterra RD, Cortes ME. Bioceramic/poly (glycolic)-poly (lactic acid) composite induces mineralized barrier after direct capping of rat pulp tissue. *Braz Oral Res* 2010;24:8-14.

- 12 Ural E, Kesenci K, Fambri L, Migliaresi C, Pinski E. Poly (P, lactide/caprolactone)/hydroxyapatite composites. *Biomaterials* 2000;21: 2147-2154.
- 13 Hench LL. The challenge of orthopaedic materials. *Curr Orthop* 2000;1:7-15.
- 14 Mendes, GC, Brandão TR, Silva CL. Ethylene oxide sterilization of medical devices: A review. *Am J Infect Control* 2007;35:574-81.
- 15 Cavalcanti BN, Rode SM, Marques MM. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. *Int Endod J* 2005;38:505-509.
- 16 Rezende TMB, Vargas DL, Cardoso FP, Ribeiro Sobrinho AP, Vieira LQ. Effect of mineral trioxide aggregate on cytokine production by peritoneal macrophages. *Int Endod J* 2005;38:896–903.
- 17 American Society for Testing and Materials: Annual Book of ASTM Standards 1992: Medical Devices. West Conshohocken, USA: ASTM.
- 18 Gala-García A, Teixeira KIR, Mendes LL, Sobrinho APR, Santos VR, Cortes ME. Effect of *Aloe vera* on Rat Pulp Tissue. *Pharm Biol* 2008;46:302–308.
- 19 Burg KJ, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2000;21:2347-59.
- 20 Legeros RZ, Lin S, Rohanizadeh R, Mijares D, Legeros JP. Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *J Mater Sci Mater Med* 2003;14:201-209.
- 21 Alliot-Licht B, Jean A, Gregoire M. Comparative effect of calcium hydroxide and hydroxyapatite on the cellular activity of human pulp fibroblasts *in vitro*. *Arch Oral Biol* 1994;39:481-489.
- 22 Higashi T, Okamoto H. Influence of particle size of hydroxyapatite as a capping agent on cell proliferation of cultured fibroblasts. *J Endod* 1996; 22:236-239.

- 23 Ignjatović N, Ninkov P, Kojić V, Bokurov M, Srdić V, Krnojelac D, Selaković S, Uskoković D. Cytotoxicity and fibroblast properties during *in vitro* test of biphasic calcium phosphate/poly-DL-lactide-co-glycolide biocomposites and different phosphate materials. *Microsc Res Tech* 2006; 69:976-982.
- 24 Young CS, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yelick PC. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res* 2002; 81:695-700.
- 25 Kim SS, Vacanti JP. The current status of tissue engineering as potential therapy. *Semin Pediatr Surg* 1999;8:119-123.
- 26 Min K, Kim H, Park H, Pi S, Hong Ch, Kim E. Human Pulp Cells Response to Portland Cement *in vitro*. *J Endod* 2007;33:163-166.
- 27 Shimabukuro Y, Ueda M, Ozasa M, Anzai J, Takedachi M, Yanagita M, Ito M, Hashikawa T, Yamada S, Murakami S. Fibroblast growth factor-2 regulates the cell function of human dental pulp cells. *J Endod* 2009;35:1529-1535.
- 28 Goldberg M, Farges JC, Lacerda-Pinheiro S, Six N, Jegat N, Decup F, Septier D, Carrouel F, Durand S, Chaussain-Miller C, Denbesten P, Veis A, Poliard A. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacol Res* 2008;58:137-147.
- 29 Lu J, Blary MC, Vavasseur S, Descamps M, Anselme K, Hardouin P. Relationship between bioceramics sintering and micro-particles-induced cellular damages. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15:361-365.
- 30 Li J, Liu Y, Hermansson L, Söremark R. Evaluation of biocompatibility of various ceramic powders with human fibroblasts *in vitro*. *Clin Mater* 1993;12:197-201.
- 31 Silva SN, Pereira MM, Goes AM, Leite MF. Effect of biphasic calcium phosphate on human macrophage functions *in vitro*. *J Biomed Mater Res B* 2003;65:475-481.

- 32 Unanue ER The regulation of lymphocyte functions by the macrophage. *Immunol Rev* 1978;40:227–255.
- 33 Kawashima N, Okiji T, Kosaka T, Suda H. Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study. *J Endod* 1996;22:311-316.
- 34 Metzger Z. Macrophages in periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* 2000;16:1-8.
- 35 Borish LC, Steinke JW. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:460-475.
- 36 Oliveira Mendes ST, Ribeiro Sobrinho AP, Carvalho AT, Souza Cortes MI, Vieira LQ In vitro evaluation of the cytotoxicity of two root canal sealers on macrophage activity. *J Endod* 2003;29:95-99.
- 37 Zhu Q, Haglund R, Safavi KE, Spangberg LS. Adhesion of human osteoblasts on root-end filling materials. *J Endod* 2000;26:404-406.
- 38 Alcaide M, Serrano MC, Pagani R, Sánchez-Salcedo S, Nieto A, Vallet-Regí M, Portolés MT. L929 fibroblast and Saos-2 osteoblast response to hydroxyapatite-betaTCP/agarose biomaterial. *J Biomed Mater Res A* 2009;89:539-549.
- 39 Higashi T, Okamoto H. Influence of particle size of hydroxyapatite as a capping agent on cell proliferation of cultured fibroblasts. *J Endod* 1996;22:236-239.
- 40 Botelho CM, Brooks RA, Best SM, Lopes MA, Santos JD, Rushton N, Bonfield W. Human osteoblast response to silicon-substituted hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res A* 2006;79:723-730.
- 41 Legeros RZ. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem Rev.* 2008;108:4742-4753.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

As pesquisas envolvendo a aplicação do compósito BC/PLGA estão na sua fase inicial e uma de suas possíveis aplicações seria no tratamento de capeamento pulpar direto. Como primeira etapa, nosso objetivo foi preparar o material e avaliar sua citotóxicidade em um modelo, *in vitro*, nas células pulpares prevalentes, em modelos específicos de fibroblastos e macrófagos. A partir da confirmação da biocompatibilidade *in vitro*, um protocolo clínico *in vivo* foi estabelecido para avaliar o material no complexo-dentino-pulpar, utilizando a técnica de capeamento pulpar direto, em um modelo animal durante 1, 7, 14 e 30 dias no estudo piloto e posteriormente de 30 e 60 dias.

Em função dos resultados obtidos nesse trabalho sobre o uso do compósito BC/PLGA para capeamento pulpar direto, sugere-se a necessidade de avaliar a atividade celular dos fibroblastos nos parâmetros de atividade de fosfatase alcalina, de grande valia para melhor entendimento dos fatores envolvidos na formação de tecidos no complexo dentino-pulpar. Da mesma forma, avaliar a ativação específica dos macrófagos em relação à produção de óxido nítrico, atividade de fagocitose e produção da enzima arginase I ao contato com o compósito BC/PLGA.

Por outro lado, as limitações encontradas no modelo animal utilizado no presente estudo nos sugerem a utilização de um modelo experimental humano, o qual representaria a continuidade da hierarquia em pesquisa com biomateriais. Em consequência obter uma evidencia científica mais forte que permita saber a real eficácia na utilização do compósito BC/PLGA.

Finalmente é de interesse conhecer as interações moleculares entre o compósito para determinar se há efeito na expressão gênica que seja capaz de estimular a ativação do fibroblasto.

9. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

GALA-GARCÍA A.: Citação científica do Alfonso Gala García

a) Artigos Completos:

1. GALA-GARCÍA, A.; TEIXEIRA, K. I. R.; WYKROTA, F. H. L.; SINISTERRA, R. D.; CORTES, M. E. Bioceramic/poly (glycolic)-poly (lactic acid) composite induces mineralized barrier after direct capping of rat pulp tissue. *Brazilian Oral Research*. v. 24, n. 1, p. 8-14. 2010.
2. GALA-GARCÍA, A.; TEIXEIRA, K. I. R.; MENDES, L. L.; SOBRINHO, A. P. R.; SANTOS, V. R.; CORTES, M. E. . Effect of *Aloe vera* on Rat Pulp Tissue. *Pharmaceutical Biology*. v. 46, p. 302-308, 2008.
3. NOVAES JR, J. B.; ARAUJO, P. V.; PIMENTA., F. D.; GALA-GARCÍA, A.; CORTES, M. E. Clinical evaluation of packable resin Class I restorations after 7 years. *Brazilian Journal of Oral Sciences* v. 7, p. 1585-1590, 2008.
4. PRETTI, H.; GALA-GARCÍA, A.; ARAÚJO, P. V.; TEIXEIRA, K. I. R.; RAMOS-JORGE, M. L.; MAGALHÃES, C. S.; MOREIRA A. N.; SÁNCHEZ, J. F. Estudio de las alteraciones en pacientes adultos con maloclusión de clase II División 1^a, tratados con extracciones de primeros premolares superiores. *Revista Española de Ortodoncia* v. 48, n. 3, p. 167-172. 2008.
5. PRETTI, H, GALA-GARCÍA, A, ARAÚJO, P. V.; RAMOS-JORGE, M. L.; MAGALHÃES, C. S.; MOREIRA, A. N.; SÁNCHEZ, J. F. Comparación entre las alteraciones encontradas en tres medidas cefalométricas y la fotografía de perfil en pacientes con Clase II, división 1. *Revista Española de Ortodoncia* v. 37, n. 3, p. 175-181. 2007.
6. GOMES, C. C.; GOMEZ, R.S.; DO CARMO, M.A.; CASTRO, W. H.; GALA-GARCÍA, A.; MESQUITA, R. A. Mucosal varicosities: case report treated with monoethanolamine oleate. *Medicina Oral Patologia Oral Cirugía Bucal* v.1, n. 11, p. 44-46. 2006.

b) Artigos completos submetidos em revistas científicas:

1. ARAÚJO, P. V.; TEIXEIRA, K. I. R.; GALA-GARCÍA, A.; PRETTI, H.; MAGALHÃES, C. S.; MOREIRA, A.N. Desempenho clínico de estudantes de Odontologia: dificuldades e estratégias na implementação de métodos objetivos de avaliação. Submetido na RGO - *Revista Gaúcha de Odontologia*. Número de correspondência 1329. 2009.
2. DINIZ, I. M. A.; PIRES, N. C.; GALA-GARCIA, A. POLETTO, L. T.A.; SANTOS, V. G. Análisis de los parámetros de desinfección en las clínicas de la facultad de odontología de la UFMG. Submetido à *Acta Odontológica Venezolana* 2009.

c) Patentes (processos ou técnica)

1. GALA-GARCIA, A.; CORTES, M. E.; SINISTERRA, R.D. Formulação Farmacêutica à base de Aloe Vera para capeamento direto em polpa dentária e como matriz para transporte de fármacos e/ou células. Número de depósito de patente na CTIT-UFMG: PI080 **2009-4**.

d) Resumos expandidos publicados em anais de congressos.

1. GALA-GARCIA, A.; SILVA, G. A. B.; SINISTERRA, R D.; CORTES, M E. *In vivo* evaluation of dentin-pulp complex response after direct capping-pulp with Bioceramic/Poly(glycolic)-poly(lactic acid) composite. In: Annual Meeting of the Society For Biomaterials, 2009, San Antonio. Society For Biomaterials 2009 Annual Meeting and expositions. Mount Laurel, NJ 08054: Society For Biomaterials SFB, 2009. p. 496-496.
2. CORTES, M.E.; MACEDO, F.A.F.F.; SINISTERRA, R.D.; GALA-GARCIA, A. Bone tissue induction, using a Bioceramic-Poli (caprolactone) composite scaffold material. In: MRS, 2008, Boston. Fall meeting. 2008.

e) Resumos publicados em anais de congressos

1. GALA-GARCÍA, A.; CARNEIRO, M. B. H.; SOUSA L. M. A.; VIEIRA, L. Q.; SINISTERRA, R. D; CORTES, M. E. Evaluación del efecto del compuesto biocerámica/ácido poli (láctico -co-glicólico) sobre la actividad de macrófagos, *in vitro*. In: ECI 2010 Encuentro Científico Internacional Ciencia y tecnología sin fronteras, 2010. Centro Cultural del Museo de la nación. Lima-Perú, 2010.
2. GALA-GARCIA, A.; FERREIRA, L. S.; SINISTERRA, R. D.; CORTES, M. E.; MARQUES, M. M. Análise da citotoxicidade *in vitro* do composto biocerâmica/ácido poli(glicólico)-poli(láctico) sobre fibroblastos pulpaes humanos. In: 26th Reunião anual da SBPqO, 2009, Águas de Lindóia. *Brazilian Oral Research*. São Paulo: SBPqO, 2009. v. 23. p. 187-187.
3. GALA-GARCIA, A.; GONTIJO, S. M. L.; PRETTI, H.; ARAUJO, P. V.; SINISTERRA, R. D.; Cortes, M. E. Evaluación antimicrobiana de esponjas de Aloe Vera L como cargador de amoxicilina o nistatina frente a microorganismos de la cavidad oral. In: ECI 2009 Encuentro Científico Internacional Ciencia y tecnología sin fronteras, 2009, Lima. ECI 2009. Lima : Universidad Tecnológica del Perú, 2009.
4. GALA-GARCIA, A.; FERREIRA, L. S.; SINISTERRA, R. D.; CORTES, M. E.; MARQUES, M. M. Análisis de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto: Bioceramica/ácido poli (glicólico)-poli (láctico) frente a los fibroblastos de la pulpa dental humana. In: ECI 2009 Encuentro Científico Internacional Ciencia y tecnología sin fronteras, Lima. ECI 2009. Lima: Universidad Tecnológica del Perú, 2009.
5. GALA-GARCIA, A.; MARQUES, M. M.; FERREIRA L S; GOMIDE, V. S.; SINISTERRA, R D; CORTES, M E. Efeito de materiais usados para capeamento pulpar (BC-PLGA) e (AV) sobre cultura de células tronco mesenquimais e fibroblastos de polpa humana. In: X Encontro de Pesquisa da Faculdade de Odontologia - UFMG VIII Encontro Científico das Faculdades de Odontologia de Minas Gerais, 2009, Belo Horizonte. *Arquivos em Odontologia*, v.45, n.1, suplemento eletrônico, 2009.

6. PEREIRA, E. M. R.; GALA-GARCIA, A; BONFIM, R. F. A.; NUNES, L. S.; CHITARRA, V. R.; SILVA, J. L. D. C.; TAVARES, W. L. F.; SILVA, F. F.; APOLÔNIO, A. C. M.; BRANDAO, M. G. L.; SANTOS, V. R. Susceptibilidade de microorganismos patogênicos orais a extratos de plantas medicinais típicas da flora brasileira. In: X Encontro de Pesquisa da Faculdade de Odontologia - UFMG VIII Encontro Científico das Faculdades de Odontologia de Minas Gerais, 2009, Belo Horizonte. Arquivos em Odontologia, v.45, n.1, suplemento eletrônico, 2009.
7. GALA-GARCIA, A.; TEIXEIRA, K. I. R.; SINISTERRA, R. D.; CORTES, M. E.. Avaliação da resposta do complexo dentino-pulpar após capeamento com compósitos de biocerâmica - PLGA, *in vivo*. In: 5 Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2008, Ouro Preto. Livro de Programa e Resumos. Belo Horizonte: Slabo, 2008. p. 136-136.
8. GALA-GARCIA, A.; SOARES, B. B. M.; CASAS, P. L.; CORTES, M. E. Avaliação do potencial de contaminação dos reservatórios de água de consultórios odontológicos. In: 25th SBPqO Annual Meeting, 2008, Águas de Lindóia. Brazilian Oral Reseach. São Paulo: 18068324, 2008. v. 22. p. 188-188.
9. GALA-GARCIA, A. ; TEIXEIRA, K. I. R. ; MENDES, L. L. ; RIBEIRO-SOBRINHO, A. P. ; SANTOS, V. R. CORTES, M. E. Evaluación de la respuesta del complejo dentino-pulpar luego del recubrimiento pulpar directo con Aloe Vera L. liofilizado, *in vivo*. In: XIV Encuentro científico internacional de verano ECI 2007v, 2007, Lima. Encuentro Científico International Verano. Lima, 2007. p. 1-1.
10. GALA-GARCIA, A.; PIMENTA, F. D.; NOVAES JR, J. B.; CORTES, M. E.; ARÃO, T C; BARREIROS, I. D. Avaliação longitudinal de restaurações classe I de resina composta condensável. In: IX Encontro de Pesquisa da faculdade de Odontologia UFMG, 2007, BH. Arquivos em Odontologia. BH : NAPq, 2007. v. 43. p. DEN001-DEN001.
11. ARAUJO, P. V.; GALA-GARCIA, A.; TEIXEIRA, K. I. R.; POLETTO, L. T. A.; CORTES, M. E. Efeito da exposição pulpar ao hidróxido de cálcio em ratos. In: IX Encontro de Pesquisa

da Faculdade de Odontologia UFMG, 2007, Belo Horizonte. Arquivos em Odontologia. BH: NAPq, 2007. v. 43. p. DEN003-DEN003.

12. ARAUJO, P.V.; GALA-GARCIA, A.; ARÃO, T.C.; CORTÉS, M.E.; NOVAES JR, J.B. Avaliação clínica de restaurações Classe I de resina composta condensável após 2 e 7 anos. In: 24a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2007, Atibaia. Brazilian Oral Research. São Paulo: USP, 2007. v. 21. p. 257-257.
13. GALA-GARCIA, A. ; TEIXEIRA, K. I. R. ; SANTOS, V. R. ; RIBEIRO-SOBRINHO, A. P. ; CORTES, M. E. . Avaliação histológica quantitativa da polpa dental após capeamento direto com Aloe vera L. liofilizado, estudo in vivo. In: 23a Reunião anual da SBPqO, 2006, Atibaia. Pesquisa Odontologica Brasileira. São Paulo: SBPqO, 2006. v. 21. p. 214-214.
14. GOMES, R. T.; TEIXEIRA, K. I. R.; CORTES, M. E.; GALA-GARCIA, A.; ALVARES, A. A.; SINISTERRA, RUBÉN DARIO. Estudo comparativo de compósitos de PLGA e hidróxido de cálcio após capeamento pulpar em ratos. In: XV Semana de Iniciação Científica da UFMG, 2006, Belo Horizonte. XV Semana de Iniciação Científica da UFMG. Belo Horizonte: UFMG, 2006.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 167/2007**, relativo ao projeto intitulado "**Estudo do reparo ósseo por compósito de poli(ϵ -Caprolactona) biocerâmica com testosterona**", que tem como responsável **Maria Esperanza Cortes Segura**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **19/12/2007**.

Este certificado expira-se em **19/12/2012**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 167/2007**, related to the project entitled "**Study of bone repair by composite poly(ϵ -Caprolactone) bioceramic with testosterone**", under the supervision of **Maria Esperanza Cortes Segura**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **December 19, 2007**.

This certificate expires in **December 19, 2012**.

Belo Horizonte, 21 de Dezembro de 2007.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 - Campus Pampulha
Unidade Administrativa II - 12º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 - Fax: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br