

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**MESTRADO EM ENDODONTIA**

**EFEITO DAS PROTEÍNAS DA MATRIZ DO ESMALTE (EMD - Emdogain®) EM POLPAS  
SÉPTICAS DE RATOS**

Linha de Pesquisa: Etiopatogênese e tratamento das doenças periodontais e  
periapicais

Dissertação apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para a obtenção do  
título de Mestre na área de Endodontia

**Carolina Cucco**

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo

Porto Alegre, Abril de 2013.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Dorotéia Cucco e Arci Cucco**, por todo apoio, incentivo e exemplo de amor e dedicação diária à Odontologia. São meus mais admirados exemplos de vida.

Ao meu irmão **Marcelo Cucco** pelo carinho, amizade e presença que tanto me fazem bem.

À **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)** e ao **CAPES** pelas oportunidades oferecidas para o desenvolvimento deste estudo.

Ao orientador **Prof. José Antônio Poli de Figueiredo** pelos ensinamentos e oportunidades oferecidas. Especialmente pelas palavras de incentivo e pelo exemplo de dedicação ao ensino e pesquisa.

Ao **Prof. Eraldo Luiz Batista Júnior** por toda a confiança demonstrada e incentivo. Agradeço especialmente pelo convívio e excepcional aprendizado.

À **Prof. Roberta Kochenborguer Scarparo** meu agradecimento especial pelo carinho, amizade, apoio, sempre companheira, presente em todas as etapas da realização deste estudo, cuidando de cada detalhe. Foi muito importante ter dividido com você esta etapa da minha vida

À amiga e colega **Cauana Oliva Tavares** pela amizade e companheirismo e intensa dedicação a este estudo.

À **Tiago Giuliani** pelos ensinamentos e pela dedicação no processamento histológico das amostras deste estudo.

À professora **Fernanda Morrone** pela disponibilização do Laboratório de Farmacologia Aplicada.

À professora **Maria Martha Campos** pela disponibilização do Laboratório de Toxicologia Pré-Clínica. Agradeço a ela também pelas brilhantes aulas ministradas.

Às minhas amigas e colegas de profissão **Litiane Paludo de Conto, Francine Konrath e Catiane Rizzato**, pela amizade incondicional que, apesar de mais distantes, sempre me acompanharam e apoiaram durante a construção deste trabalho.

***A todos vocês meus sinceros agradecimentos.***

## ÍNDICE

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	7
1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA .....	8
1.1 ETIOPATOLOGIA PULPAR.....	8
1.2 TRATAMENTOS CONSERVADORES DA POLPA.....	10
1.3 CAPEAMENTO PULPAR DIRETO - MATERIAIS.....	13
1.4 PROTEÍNAS DA MATRIZ DO ESMALTE (EMD).....	16
2. OBJETIVOS .....	19
2.1. OBJETIVO GERAL .....	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
3. CAPÍTULO 1.....	20
Artigo 1: Effects of the enamel matrix derivative Emdogain® on rat infected pulp tissue.....	20
4. DISCUSSÃO GERAL.....	36
5. CONCLUSÃO.....	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

## RESUMO

A Endodontia tem como objetivo a prevenção e o tratamento das doenças da polpa e dos tecidos periapicais. Embora a manutenção da vitalidade pulpar seja de fundamental importância, tratamentos conservadores não são comumente indicados para dentes com polpa exposta por cárie. Nestas situações, o tratamento conservador costuma ser indicado somente para dentes jovens com ápice aberto. Para os demais casos indica-se o tratamento radical, a endodontia. A relutância em se realizar um tratamento conservador em um dente permanente com polpa exposta por cavidade profunda de cárie está na dificuldade de um diagnóstico preciso quanto à condição pulpar de inflamação reversível e irreversível e na falta de uma substância que possa fazer esse tecido retornar a homeostase. Neste sentido, o presente estudo avaliou histologicamente os efeitos do Emdogain® (EMD) e o seu veículo, propileno glicol alginato (PGA) em polpas dentárias infectadas de ratos. Para isto foram utilizados 24 molares inferiores de ratos Wistar machos com 8 semanas de idade. A câmara pulpar foi perfurada e as cavidades ficaram expostas à cavidade oral por um período de 24 h. Após, as superfícies pulpares foram capeadas utilizando Emdogain® (n=6) ou PGA (n=6) como controle, e em seguida foram restauradas com cimento de ionômero de vidro. Passados os tempos experimentais de 48 h e 30 dias, os animais foram eutanasiados e as mandíbulas foram dissecadas para avaliação histológica. Os resultados encontrados mostraram que não houve formação de barreira de tecido duro em nenhum dos grupos e tempos experimentais avaliados. No período experimental de 30 dias, o grupo EMD apresentou reduzido processo inflamatório, este sendo limitado ao sítio de exposição, e alterações degenerativas em toda a extensão do canal radicular foram

predominantes neste grupo. Sendo assim, estes resultados sugerem que o EMD não foi efetivo em promover adequado reparo tecidual em polpas infectadas de ratos.

## ABSTRACT

Endodontic aims to prevent and treat diseases of the pulp and periapical tissues. Although the maintenance of pulp vitality is of paramount importance, conservative treatments are not commonly recommended for teeth with pulp exposure by caries. In these situations, conservative treatment is usually indicated for young teeth with open apex. For all the other cases a radical treatment is indicated, the root canal treatment. The reluctance in performing a conservative treatment in a permanent tooth with exposed pulp by caries is due to the difficulty of an accurate diagnosis, as to the condition of pulp inflammation (reversible or irreversible) and in the absence of a compound that promote this tissue to return to homeostasis . Thus, the present study evaluated histologically the effects of Emdogain<sup>®</sup> (EMD) and its vehicle, propylene glycol alginate (PGA), in rat infected dental pulp. For this, the pulp chambers of the right lower molars of 24 male *Wistar* rats were perforated and the cavities were left open to the oral environment for 24 h. Then, the exposed pulp surfaces were direct capped with either EMD or its carrier PGA (n=6), and the cavities were restored with glass-ionomer cement. After the experimental period of 48 hours and 30 days, the animals were euthanized and the dissected mandibles were histologically evaluated. The results showed that a hard tissue barrier was absent in the EMD and PGA groups in the two evaluation periods. At 48 h the groups exhibited similar pulp behavior. At 30 days, the group capped with EMD showed a reduced inflammatory process limited to the exposed area, and degenerative changes on the pulp tissue throughout the length of the root canals. Thus, our results suggest that EMD was not effective on the providing proper wound healing of infected rat molar pulp.

## 1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

### **1.1 Etiopatologia das alterações pulpare**

A Endodontia busca a prevenção e tratamento das doenças da polpa e dos tecidos periapicais. Em condições normais a polpa dental é estéril, estando envolvida na produção de dentina e na sensibilidade dentinária. Polpa e dentina formam um complexo funcional, protegido de substâncias exógenas pelo esmalte e cimento. Quando o complexo dentino-pulpar torna-se infectado, os tecidos, dotados de processos imunocompetentes, reagem à invasão bacteriana na tentativa de erradicá-la. Entretanto, se a rota da infecção não é eliminada através desse processo natural, ou por procedimentos operatórios, as bactérias invadem o complexo, resultando em pulpite e necrose pulpar, infecção do sistema de canais radiculares e doença periapical (Love & Jenkinson, 2002).

Estudo clássico confirmou o papel das bactérias na etiopatologia das doenças pulpare e perirradiculares (Kakehashi, Stanley & Fitzgerald, 1965); polpas dentais de ratos mantidos em condições convencionais e *germ-free* foram expostas ao meio bucal e observadas histologicamente. Enquanto nos animais mantidos em ambiente séptico desenvolveu-se inflamação severa ou necrose pulpar associada a lesões perirradiculares, nos animais *germ-free* as polpas se repararam por deposição de dentina neoformada na área da exposição, isolando o tecido pulpar da cavidade oral.

A polpa dental inclui elementos celulares como nervos, tecido vascular, fibras do tecido conjuntivo, matriz extracelular, fluido intersticial, odontoblastos, fibroblastos e células imunocompetentes. Ela torna-se inflamada como consequência de infecção

bacteriana a partir de cáries, trauma, ou por alguma razão iatrogênica. Quando a dentina é amplamente invadida, a infecção bacteriana também afeta a polpa que reage através da diminuição da permeabilidade dentinária, formação de dentina ou reação inflamatória e imune (Love & Jenkinson, 2002; Goldberg et al., 2008; Hahn & Lieweher, 2007). O processo inflamatório desse tecido é extremamente complexo, sendo as mudanças na polpa dental acompanhadas de ampla variedade de mediadores químicos, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de leucócitos que são recrutados por mediadores endógenos como cininas, prostaglandinas e neuropeptídeos (Hahn & Lieweher, 2007; Trope, 2008). O tecido pulpar é equipado para montar resposta inata às bactérias; não sendo eficaz essa resposta na eliminação do agressor, a resposta imune adaptativa é ativada (Goldberg et al., 2008; Hahn & Lieweher, 2007). A própria defesa do hospedeiro pode levar a uma exacerbação da inflamação, resultando em aumento de edema e pressão intra-pulpar. Como a polpa dental está inserida em uma cavidade rígida, que são as paredes mineralizadas do dente, este processo torna-se extremamente lesivo (Goldberg et al., 2008; Pisterna & Suragusa, 2007).

Polpas inflamadas podem se recuperar contanto que a maioria dos antígenos sejam removidos suficientemente cedo a ponto de não induzirem alterações inflamatórias que levem ao dano irreversível do tecido. Assim, o conhecimento da resposta inflamatória pode levar a abordagens que modifiquem o medicamento de escolha para casos de cárie moderada à profunda (Hahn & Lieweher, 2007).

## **1.2 Tratamentos conservadores da polpa**

Em função da importância da prevenção na Odontologia atual, todos os procedimentos envolvidos na prática clínica devem ser direcionados à preservação da estrutura dental sadia e à manutenção da integridade do complexo dentino-pulpar. Sendo assim, após a exposição accidental ou em decorrência de lesões de cárie dental ou traumatismos, torna-se necessário decidir, do ponto de vista endodôntico, qual a melhor conduta a ser adotada, anteriormente à restauração definitiva do elemento dental.

Embora exista o consenso da terapia pulpar conservadora, principalmente pulpotomia, em dentes com formação incompleta da raiz, e o alto índice de sucesso nestes dentes, ainda existem muitas divergências em relação ao capeamento pulpar e pulpotomia em dentes permanentes maduros (Assed & Da Silva, 2005).

A terapia pulpar conservadora objetiva o tratamento da injúria reversível com manutenção da vitalidade e função (Asgary et al., 2008; Tziafas 2004). Pode ser classificada de acordo com algumas abordagens terapêuticas em: capeamento pulpar indireto, capeamento pulpar direto, curetagem pulpar ou pulpotomia parcial e pulpotomia (Camp, 2000). O capeamento pulpar indireto é uma técnica que evita a exposição pulpar nos dentes com cáries profundas, nos quais não existe evidência clínica de degeneração da polpa ou alteração periapical. Este procedimento permite ao dente utilizar mecanismos naturais de defesa da polpa contra a cárie. Baseia-se na teoria de que existe, entre a camada externa de dentina infectada e a polpa, uma zona contaminada de dentina desmineralizada. Quando a dentina infectada é removida, a dentina contaminada pode sofrer remineralização e os

odontoblastos formar dentina reparadora, evitando assim uma exposição da polpa (Consolaro, 2008). O capeamento pulpar direto e a remoção de toda a polpa coronária, denominada pulpotomia, envolvem a aplicação de um medicamento com potencial farmacológico diretamente sobre a polpa exposta, na tentativa de manter a sua vitalidade (Camp, 2000). Conceitualmente, capeamento pulpar direto é o método de tratamento no qual a polpa dental exposta é coberta com material que a protege de injúrias adicionais e permite sua cicatrização e reparo (Tziafas et al., 2002). A pulpotomia difere do capeamento pulpar porque uma parte da polpa remanescente é removida antes da aplicação do medicamento. Existe ainda outra técnica, denominada curetagem pulpar ou pulpotomia parcial, onde os dentes com exposições cáries profundas são submetidos à remoção de 1 a 3 mm da polpa exposta (Camp, 2000). Essa área exposta é então coberta com material biológico e procede-se com o selamento do dente. O sucesso da terapia pulpar conservadora depende do tipo e localização da injúria, idade do dente, modalidade de tratamento, propriedade biológica do material capeador e integridade da restauração coronária (Aguilar & Linsuwanont, 2011; Trope, 2008; Barthel et al., 2000). Enquanto a polpa inflamada não exposta por cárie ou trauma apresenta potencial de reparo, o tratamento da polpa exposta, principalmente por cárie, continua sendo motivo de controvérsia (Engstrom & Lundberg, 1965; Pisterna & Siragusa, 2007). Quando produtos bacterianos induzem a inflamação pulpar, acionam respostas flogísticas que impedem a instalação de mecanismos de reparo da polpa (Bogen, Kim & Bakland, 2008). Nesse contexto, polpas jovens têm melhor potencial de reparo, o que pode ser atribuído à presença de forame apical grande e maior vascularização da polpa, na qual células imunes ativas podem

aumentar as chances de reparo e intensificar a manutenção da vitalidade pulpar (Trope, 2008; Bogen, Kim & Bakland, 2008).

Capeamentos pulparem diretos com pasta de hidróxido de cálcio executados em polpas expostas durante a remoção de tecido cariado revelaram 37% de sucesso após 5 anos e 13% de sucesso após 10 anos (Barthel et al., 2000). Em outro estudo, também com exposição pulpar na remoção de tecido cariado, obteve-se 97,96% de sucesso, entretanto, nesse último foi utilizado o MTA como material capeador e o acompanhamento foi realizado por um período de no máximo 9 anos (Al-Hiyasat et al., 2003). Os autores consideraram importante para o sucesso da terapia o diagnóstico de pulpíte reversível, ausência de patologias apicais ou dentes com exposição mecânica ou que sofreram algum tipo de trauma recentemente, antes do tratamento (Konche, 1970; Al-Hiyasat et al., 2003); porém a dificuldade está exatamente em definir o diagnóstico de pulpíte reversível ou irreversível. Os sinais clínicos e sintomas como intensidade e característica da dor não refletem precisamente a condição da polpa (Bogen, Kim & Bakland, 2008; Seltzer, Bender & Ziontz, 1963; Mitchell & Tarplee, 1960). Os testes de sensibilidade, por exemplo, testes térmicos ou elétricos, revelam somente um sim ou não como resposta (Seltzer, Bender & Ziontz, 1963; Garfunkel, Sela & Ulmanky, 1973). Atualmente, muitos estudos têm demonstrado sucesso na terapia conservadora em dentes vitais com polpa exposta por cárie (Matsuo et al., 1996; Teixeira et al., 2001). Assim, apesar da dificuldade em se encontrar um consenso na literatura sobre a taxa de sucesso dos tratamentos conservadores da polpa, o tempo de observação, os critérios de avaliação e a condição pulpar antes do

procedimento estabelecido parecem ter um papel decisivo (Barthel et al., 2000; Al-Hiyat et al., 2003; Bogen, Kim & Bakland, 2008).

### **1.3 Capeamento pulpar direto - Materiais**

O hidróxido de cálcio, por suas reconhecidas propriedades, tem sido utilizado, por muitos anos, como o material de escolha para capeamento pulpar direto (Goldberg et al., 2008; Asgary et al., 2008; Accorinte et al., 2008). A atividade antibacteriana, biocompatibilidade, estímulo de formação de ponte de dentina, indução de dentina reparadora, estímulo da atividade celular e liberação de moléculas bioativas, têm sido associadas ao seu sucesso (Accorinte et al., 2008). Contudo, algumas preocupações têm surgido quanto ao seu uso, como a inconstância na estrutura de ponte de dentina formada (Goldberg et al., 2008; Bogen, Kim & Bakland, 2008; Nair et al., 2008), extensa deposição de matriz dentinária obliterando a câmara pulpar, efeito por curto prazo, alta solubilidade aos fluidos orais, falta de adesão ao tecido dentário e degradação ao condicionamento ácido (Bogen, Kim & Bakland, 2008; Accorinte et al., 2009).

Quanto ao mecanismo de ação, devido ao seu pH alcalino, o hidróxido de cálcio induz necrose na superfície exposta da polpa. Abaixo da cicatriz produzida, dentro de poucos dias e quando o processo inflamatório inicia sua resolução, células reparadoras são recrutadas da parte central da polpa. Ocorre então a proliferação e diferenciação destas células até o completo reparo do tecido (Goldberg et al., 2008). Células pulpares diferenciam-se em odontoblastos que produzem matriz extracelular a qual servirá de arcabouço para uma ponte reparadora de dentina mineralizada (Tziafas,

2004; Goldberg et al., 2008; Trope, 2008). Essa estrutura recém formada é uma osteodentina não homogênea, incluindo túneis defeituosos equivalentes a lacunas de osteócitos e remanescentes pulpares, é permeável e não resiste à recolonização bacteriana (Kojima, Inamoto & Nagamatsu, 2004; Pisterna & Siragusa, 2007).

Por estes motivos, alguns materiais têm sido testados como alternativa ao hidróxido de cálcio. Um dos mais promissores é o agregado de trióxido mineral (MTA). Este tem sido utilizado para diversas aplicações, como capeamento pulpar (Nair et al., 2008; Accorinte et al., 2008), reparo de perfurações (Arens & Torabinejad, 1996; Holland et al., 2001), apexificações (Felippe et al., 2006) e tampões apicais (Torabinejad et al., 1993; Torabinejad et al., 1995). Pitt Ford et al. (1996) foram os primeiros a avaliar o comportamento do MTA como capeador pulpar direto em dentes de macacos, e eles demonstraram resultados superiores quando comparado ao hidróxido de cálcio. Após testar os dois materiais em polpas de cães, Faraco e Holland (2001) concluíram que o MTA alcança os melhores resultados, entretanto as diferenças não são estatisticamente diferentes. Comparações entre MTA e hidróxido de cálcio para capeamento pulpar direto em dentes de cães mostraram resultados distintos: inflamação pulpar não foi observada com o MTA, ocorrendo formação completa de ponte de dentina na maioria dos casos. Já o hidróxido de cálcio produziu inflamação pulpar e ponte de dentina incompleta (Asgary et al., 2008). Resultados similares foram encontrados em dentes humanos; enquanto o MTA não demonstrou inflamação pulpar e evidenciou a formação de uma barreira de tecido duro compacta, o hidróxido de cálcio revelou formação de barreira menos consistente, com numerosos túneis defeituosos e inflamação pulpar (Nair et al., 2008).

O mecanismo com que o MTA induz formação de ponte dentina pode ser similar ao do hidróxido de cálcio (Asgary et al., 2008), porém parece ser mais eficaz (Nair et al., 2008). Entre as propriedades favoráveis do MTA estão alta alcalinidade, efeito bactericida, excelente selamento, biocompatibilidade (Asgary et al., 2008; Bogen, Kim & Bakland, 2008; Nair et al., 2008), não ser reabsorvível e ter alta resistência à compressão (Bogen, Kim & Bakland, 2008).

A formação de dentina após capeamento pulpar envolve diferenciação de células pulpares com elaboração de dentina reparadora. Esse fenômeno requer interação entre moléculas da matriz extracelular (ECM) e fatores de crescimento como o TGF- $\beta$ . Estudos em animais com aplicação de fatores de crescimento e moléculas da matriz extracelular como materiais capeadores resultaram em formação de tecido duro (Tziafas et al., 2002; Tziafas, 2003).

Quando sialoproteína óssea (BSP), uma proteína osteogênica, foi implantada em polpas de ratos, houve formação homogênea de tecido duro. Aparentemente, a BSP estimula a diferenciação de células que secretam matriz extracelular de forma mais eficiente que outros materiais (Decup et al., 2000).

O plasma rico em plaquetas (PRP) é conhecido por ser fonte de fatores de crescimento (Marx & Garg, 1998). Este pode ser facilmente obtido do sangue do próprio paciente, e apresentou bons resultados quando utilizado como capeador pulpar em incisivos de ratos (Orhan et al., 2012).

A exploração de moléculas bioativas tem levado alternativas promissoras para o tratamento do complexo dentino-pulpar (Tatsunari & Matsumoto, 2003). Pesquisas

têm apontado o uso de fatores de crescimento em tratamento regenerativos, através de um processo que imita os eventos fisiológicos, mas a taxa de sucesso com este tipo de tratamento ainda é questionável (Sloam & Smith, 1999).

Neste sentido, um produto de origem proteica comercialmente disponível, composto de proteínas derivadas da matriz do esmalte (Emdogain, Straumann AG, Suíça), demonstrou formação de dentina reparadora ao longo das paredes dentinárias de molares de ratos com amputação pulpar (Igarashi et al., 2003).

#### **1.4 Proteínas da matriz do esmalte (EMD)**

As proteínas da matriz do esmalte são conhecidas por desempenhar importante papel biológico na formação de dentina, cemento acelular e osso alveolar durante o desenvolvimento dentário (Hammarstrom, 1997).

Têm sido utilizadas para o tratamento de defeitos intra-ósseos em pacientes com periodontite severa ou avançada, regenerando os tecidos afetados (Hammarstrom, 1997), na estimulação de cementogênese para restaurar o ligamento periodontal, cemento e osso alveolar (Nakamura, 2002), e, quando aplicado na superfície de raízes dentárias expostas, formou uma matriz que facilita localmente respostas regenerativas no ligamento periodontal adjacente (Lyngstadaas, 2001). Ainda, as EMD parecem aumentar a liberação autócrina dos fatores de crescimento TGF- $\beta$  e PDGF, que estão associados ao início da diferenciação de odontoblastos (Igarashi et al., 2003).

O Emdogain® (Straumann AG, Basel, Suíça) é um gel propilenoglicol alginato que contém proteínas derivadas da matriz do esmalte secretadas pela bainha epitelial

de Hertwig durante o desenvolvimento dentário (Nakamura et al., 2004). Este composto tem como principal componente da proteína da matriz do esmalte é a amelogenina, que tem um importante papel na formação de dentina durante a dentinogênese (Hammarstrom, 1997; Veis et al., 2000).

Estudo com cultura de células-tronco proveniente de germes dentários humanos avaliou os efeitos do EMD na proliferação e diferenciação de odontoblastos, e comparou com MTA e pasta de hidróxido de cálcio. Mostrou que o EMD aumenta a regeneração de tecido duro e sugere que este material seja utilizado combinado com MTA ou hidróxido de cálcio para aumentar a eficácia do capeamento pulpar (Guyen et al., 2011).

Alguns estudos realizados em modelos animais têm demonstrado que o EMD, quando utilizado como capeador pulpar, pode induzir melhor formação de tecido dentinário com menor ou nenhum defeito quando comparado ao hidróxido de cálcio (Nakamura et al., 2000; Nakamura et al., 2004 Al-Hazaimi et al., 2011).

As EMD foram utilizadas como capeador pulpar direto em polpas expostas humanas e comparadas com hidróxido de cálcio, durante um período de 3 e 6 meses. Observou-se formação de tecido duro, mas não em forma de ponte, como ocorreu nos dentes capeados com hidróxido de cálcio, porém os resultados clínicos e radiográficos de ambos os materiais foram semelhantes (Olsson et al., 2005; Kiatwateeratana et al., 2009).

Ainda, quando associou-se EMD ao MTA e comparou-se com hidróxido de cálcio, foi comprovado que os primeiros produzem pontes de dentina reparadora de melhor qualidade (Min et al., 2009).

Como podem ser observados, os eventos celulares distribuídos temporalmente no processo de instalação e reparo dos tecidos pulpaes são, como em outros sistemas biológicos, de suma importância. Nesse contexto, o emprego de um composto biocompatível que associe propriedades antimicrobianas, antiinflamatórias e reparadoras capazes de sustar a desorganização tecidual mediada por vetores infecciosos ainda não foi idealmente caracterizado.

O presente estudo justifica-se pelo interesse em se obter um composto que atue no reparo do tecido pulpar exposto por lesões de cárie profunda, induzindo a formação de dentina reparadora de forma eficiente para a regeneração dentária, possibilitando a manutenção da vitalidade pulpar. O Emdogain® foi empregado nesse estudo como candidato a esta substância, com potencial de auxiliar o processo de dentinogênese reparadora em tratamentos conservadores de polpas dentárias sépticas.

## **2. OBJETIVOS**

### ***2.1. Objetivo geral***

Avaliar o efeito das proteínas da matriz do esmalte (Emdogain®), sobre a polpa dentária de ratos exposta à cavidade bucal.

### ***2.2. Objetivos específicos***

2.2.1. Avaliar o efeito das proteínas derivadas da matriz do esmalte (Emdogain®) e seu veículo propilenoglicol alginato (PGA) quanto às características inflamatórias, sobre a polpa dentária exposta à cavidade bucal.

2.2.2. Avaliar o efeito o Emdogain® e do PGA quanto à formação de dentina reparadora, quando utilizada para capeamento pulpar direto.

## **Capítulo 1**

### **ARTIGO**

#### **Histological analysis of the effects of the enamel matrix derivative Emdogain® on infected rat pulp tissue**

Formatado segundo as normas do periódico Journal of Endodontics, fator de impacto 2.80 e classificação A1 segundo a Capes.

**Histological analysis of the effects of the enamel matrix derivative Emdogain® on infected rat pulp tissue**

**Carolina Cucco DDS<sup>1</sup>, Roberta Kochenberger Scarparo PhD<sup>1</sup>, Cauana Oliva Tavares DDS<sup>1</sup>, José Antônio Poli de Figueiredo PhD<sup>1</sup>, Eraldo Luiz Batista Júnior PhD<sup>2</sup>**

1. Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

2. University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada

Corresponding Author

Eraldo L. Batista Jr. DDS, MSc., DSc.

Associate Professor of Periodontology | Department of Diagnostics and Surgical Sciences

Faculty of Dentistry | University of Manitoba

D344B-790 Bannatyne Ave., Winnipeg, MB R3E 0W2, CANADA

Phone: (204) 789-3367

[eraldo.batista@me.com](mailto:eraldo.batista@me.com)

## **Histological analysis of the effects of the enamel matrix derivative Emdogain® on infected rat pulp tissue**

### **Abstract**

Introduction: This study evaluated the behavior of infected rat molar pulps after capping with enamel matrix derivative (EMD; Emdogain®) and its vehicle propylene glycol alginate (PGA). Methods: The pulp chambers of the right lower molars of 24 male *Wistar* rats were perforated and the cavities were left open to the oral environment for 24 h. Then, the exposed pulp surfaces were direct capped with either EMD or its carrier PGA (n=6), and the cavities were restored with glass-ionomer cement. Following 48 h and 30 days, the dissected mandibles were histologically evaluated. Results: Hard tissue barrier was absent in the EMD and PGA groups in the two evaluation periods. At 48 h the groups exhibited similar pulp behavior. At 30 days, the group capped with EMD showed a reduced inflammatory process limited to the exposed area, and degenerative changes on the pulp tissue throughout the length of the root canals. Conclusions: Our results suggest that EMD was not effective on the providing proper wound healing of infected rat molar pulp.

### **Introduction**

Pulp vitality is of paramount importance for the tooth viability, since it provides nutrition and acts as biosensor to detect potential damage (1). Moreover, the attempt to keep pulp alive is even more justified either in that cases in which the completion of root development is warranted or when financial or systemic reasons put extraction as the only other alternative (2,3). Traditionally, capping with calcium hydroxide has been indicated for the treatment of mechanical or fresh traumatic exposure of pulp, protecting tissue from additional damage, thereby facilitating healing and repair (4-6). In these cases, high success rates have been observed (5-7).

Nevertheless when the pulp tissue of permanent teeth is exposed by caries, pulp capping appears to promote uncertain outcomes (2). In this situation, potential

for pulp recovery is reduced by preoperative infection (8,9). Thus, attempts to develop more effective pulp-capping materials are regarded. Recently, enamel derivative matrix proteins (EMD), known to induce mesenchymal cell differentiation, has been evaluated as a pulp protective dressing material, showing hard tissue bridge formation (10-12) and reduction of postoperative symptoms (13). EMD is commercially available as Emdogain (Straumann AG, Basel, Switzerland), being mainly composed by amelogenins and other proteins secreted by the Hertwig's sheet during root development (14). Apart from pulp capping in non-infected dental pulp, this compound was reported to promote effective results in pathologies such as periodontal disease (15) and root formation/repair in necrotic immature teeth (16), in which bacterial triggered inflammation occurs.

On these grounds, the evaluation of EMD applied as a protective dressing material in the presence of pulp microbial infection has yet to be investigated. Therefore, the goal of the present study is to evaluate the behavior of rat molar pulp exposed to oral bacteria following EMD-capping

## **Material and methods**

The study protocols were approved by Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul Institutional Animal Care and Use Committee (protocol 11/00267). Twenty-four (24) male Wistar rats were used. Experimental procedures were carried out under intraperitoneally anesthetized with 0,8 ml/100 g of ketamine and 0,2 ml/100 g of xylazine (Virbac do Brasil, Jurutuatuba, SP, Brazil).

Endodontic access was performed in the lower first molar in 8 weeks-old animals. The mouth opening was maintained using a previously designed device (17). Deep cavities on the central portion of the occlusal surface were performed with a 1011 HL round bur in high speed (KGSorensen, Cotia, SP, Brazil) to a depth slightly smaller than the bur diameter (1 mm). Then, pulp exposure was accomplished by the application of pressure with the tip of a steel probe through the remaining thickness of

dentin. Slight bleeding stopped after few seconds. The teeth were left open to the oral environment during 24 hours.

Then, the animals were anesthetized again and the debris from inside the cavities was removed with 0.9% sterile saline solution. The cavities were gently dried with sterile cotton pellets before being capped with Emdogain® (Straumann AG, Basel, Switzerland) or its vehicle propylene glycol alginate (PGA) as experimental controls

The cavities were then sealed with glass-ionomer cement (VitroFill LC, DFL Ind Com, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). The animals were divided into 2 experimental periods (48 hours and 30 days, n=6 per group/period). After euthanasia by inhalation of isoflurane, the jaws were dissected for histological evaluation.

#### *Sample preparation for light microscopy*

Samples were fixed with buffered 10% paraformaldehyde for 24 h, decalcified in a mixed solution containing 0.7 g of 17% EDTA, 8 g of potassium tartrate, 0,14 g of sodium tartrate, 120 ml of 37% chloridric acid and 900 ml of water for 2 days. Next, the samples were dehydrated in ascending concentrations of ethanol and embedded in paraffin. Five- $\mu$ m serial sections were stained with hematoxylin and eosin. Six sections were selected for each sample, so the central portion of dental pulp was visible.

#### *Histological analysis*

The cut sections were observed under light microscopy (Nikon E200, Tokyo, Japan) with magnifications of 40x, 250x and 400x. A histological descriptive analysis was performed by two blinded examiners, emphasizing intensity and extension of pulp damage forward the application of the protocols. Vascular congestion and cellular inflammatory response, as well as reduction of tissue cellularity and the presence of hyalinization and fibrous areas, was considered. Moreover, the presence of periapical inflammation and hard tissue barrier formation tissues were observed.

## Results

The main outcomes of histological analysis are described in **Table 1**.

### ***Forty eight hours period***

At the 48-hours experimental period both PGA and EMD-capped pulps showed moderate inflammatory process beneath the exposure area, mainly comprised of neutrophils and limited to root canal entrance in most of the samples (Figures 1 and 2). Above, fiber condensation was identified (Figure 1). Odontoblastic layer disruption, as well as abscessed areas (Figure 2) occurred next to dental pulp site of exposure, being restricted to the coronal portion. Congested blood vessels were increased beneath the inflammatory front (Figures 1 and 2). Degenerative alterations, such as hyalinization (Figures 1 and 2) were detected, although in restrict areas and with mild intensity. Neither periapical alterations nor mineralized tissue formation were evidenced.

### ***Thirty days experimental period***

At 30 days after pulp exposure, the formation of a hard tissue barrier or dentin bridge was not evidenced neither in the EMD nor in PGA-capped groups. Odontoblastic layer was disrupted throughout the entire root canal. A degenerative process was predominant in EMD group, featured by pulp fibrosis, decreased vascularization, reduced cellularity and intense hyalinization areas were extended along the canal length (Figure 3 A). In most of the samples, PGA-capped group showed pulp necrosis (Figure 3 B). In contrast, fully necrotic pulps were not observed in the EMD-capped pulp, although tissue fibrosis, low numbers of cells, poor vascularization and absence of odontoblastic layer should be considered as irreversible damage.

## Discussion

The current results showed that, in dental pulp exposed to oral bacteria, EMD was not effective on the formation of a hard tissue barrier. Moreover, inflammatory and degenerative alterations were not diminished by the use of this biocompound. Previously, EMD was shown to be effective on the formation of reparative dentin and mineralized bridges in non-infected rat molars (10,12). Besides, the formation of a hard tissue barrier on human pulps after capping or partial pulpotomy was also reported (13,18). These data, in conjunction with EMD potential to favor periapical repair, root development (16) and periodontal regeneration (15) following bacterial-triggered inflammation lead to the assumption that infected dental pulp could positively respond to these protein compound.

Probably, in the situations cited above, the adjunctive use of mechanical debridement and antimicrobial chemical substances posed an effect on the treatment outcomes. As a matter of fact, EMD intracanal medication in non-vital teeth was employed after sodium hypochlorite irrigation and mechanical intervention on the cervical portion of root canal (16). Furthermore, prior to EMD application on periodontal surgery, tissues curettage and scaling of the remaining sub gingival plaque and calculus was carried out (15). Also in support of the current findings, it has been previously reported that *P. gingivalis* seems to diminish the effect of EMD on periodontal ligament cells migration and proliferation *in vitro* (19), although it has been reported to suppress the growth of microorganisms (20).

The effects of microorganisms appears to be amplified in dental pulp cavity, once it is inside rigid walls and present limited circulation, which results in a reduced capacity to recover if compared with non-confined tissues. Regarding the employment of disinfection solutions prior to the placement of pulp dressing materials, some authors suggest the use of hydrogen peroxide, chlorhexidine or various concentrations of sodium hypochlorite for achieving hemostasis (21, 22). Meanwhile, in the present study these substances were avoided in order to allow the observation of EMD effect itself. Besides, chemical disinfection is limited by the substances abilities to not arrest

pulp response, which influences on the indication of sterile saline solution to control bleeding, as recommended in other studies (23,24).

The absence of EMD effective antimicrobial activity could have a negative influence regarding post-operative leakage of bacteria through coronal sealing (4). On the other hand, even when a dressing material known to be regarded of antimicrobial activity, i.e. calcium hydroxide, is used, the outcomes of pulp capping in cariously exposed tissue are compromised (2,3). On these grounds, other protocols for vital pulp therapy should be considered in order to increase the efficiency of pulp healing. One of the possible approaches is to remove larger amounts of the coronal pulp tissue, aiming at eliminate the potentially infected tissue. Accordingly, the success rate of direct pulp capping was observed to be uncertain, while treatments that apply larger safety margin for pulpal removal, such as partial pulpotomy and full pulpotomy, sustained a higher success rate (25,26). Nevertheless, the experimental model employed herein presents some limitations for testing these protocols, considering the size of rat molars and the difficulties for establishing the actual amount of pulpal removal. On the other hand, the use of rats for testing pulp-capping materials is well established in the literature, considering similarities between rats and humans, which accomplish pulp tissue features and responses, as well as the oral bacteria flora (27).

To standardize the extension of pulpal exposures, the application of pressure with the tip of a steel probe through the remaining thickness of dentin after drilling deep cavities was performed.

The histologic findings presented herein showed that, regardless of the group, and especially at the first experimental period, the inflammatory process occurred at the meantime with the degenerative alteration, which has been previously demonstrated (28). Apart from inflammatory process, these features certainly played a role on the poor outcomes of treatment protocols. Generally, EMD showed similar results if compared to PGA, except for the faster progression of complete pulp necrosis at the control group, as demonstrated in some samples at the second experimental period.

EMD was reported to down-regulate IL-1 $\beta$ , IL-8 (29) and metalloproteinase-8 (30) expression, which could influence on the slow speed of pulpal damage, as well as on the prevention of inflammation spread. On the other hand, the degenerative events that take place following the treatment of infected pulp tissue should be considered as irreversible damage. Unlike previously observed in non-infected dental pulp (10-11) EMD was not capable to promote adequate healing. Thus microbial infection appears to have a definitive role in the fate of EMD-capped pulp tissue.

### **Conclusion**

EMD was not effective on providing proper wound healing of infected rat molar pulp.

### **References**

1. Zhang W, Yelik P. Vital pulp therapy – current progress of dental pulp regeneration and revascularization. *Int J Dent* 2010;1-9.
2. Ward J. Vital pulp therapy on cariously exposed permanent teeth and its limitations. *Aus Endod J* 2002;28:29-37.
3. Swift EJ Jr, Trope M, Ritter A. Vital pulp therapy for the mature tooth – can it work? *Endod Topics* 2003;5:49-53.
4. Al-Hezaimi K, Al-Tayar B, Bajuaifer YS, Salameh Z, Al-Fouzan K, Tay FR. A hybrid approach to direct pulp capping by using Emdogain with a capping material. *J Endod* 2011;37:667-72.
5. Barthel CR, Rosenkranz B, Leuenberg A, Roulet J-F. Pulp capping of carious exposures: treatment outcome after 5 and 10 years: a retrospective study. *J Endod* 2000;26:525-8.
6. Stanley HR, Pameijer CH. Dentistry's friend: calciumhydroxide. *Oper Dent* 1997;22:1–3.
7. Willershausen B, Willershausen I, Ross A, Velikonja S, Kasaj A, Blettner M. Restrospective study on direct pulp capping with calcium hydroxide. *Quint Int* 2011;42:165-71.
8. Murray PE, About I, Lumley PJ, Smith G, Franquin JC, Smith AJ. Postoperative pulpal and repair responses. *J Am Dent Assos* 2000;131:321-9.

9. Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent* 2000;28:77-92
10. Nakamura Y, Hammarström L, Lundberg E, et al. Enamel matrix derivative promotes reparative process in the dental pulp. *Adv Dent Res* 2001;15:105-7.
11. Nakamura Y, Hammarström L, Mastsumoto K, Lyngstadaas SP. The induction of reparative dentin by enamel proteins. *Int Endod J* 2002;35:407-17.
12. Igarashi S, Sahara T, Shimizu-Ishiura M, Sasaki T. Porcine enamel matrix derivative enhances the formation of reparative dentine and dentin bridges during wound healing of amputated rat molars. *J Electron Microsc* 2003;52:227-36.
13. Olsson H, Davies JR, Holst KE, Schroder U, Petersson K. Dental pulp capping: effect of Emdogain Gel on experimentally exposed human pulps. *Int Endod J* 2005;38:186-94.
14. Hammarstrom L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol* 1997;24:658-68.
15. Heiji L, Heden G, Svardstrom G, Ostreg A. Enamel matrix derivative (EMDOGAIN) in the treatment of intrabony periodontal defects. *J Clin Periodontol* 1997;24:705-14
16. Scarparo RK, Dondoni L, Böttcher DE, et al. Apical periodontium response to enamel matrix derivative as na intracanal medication in rat immature teeth with pulp necrosis: radiographic and histologic findings. *J Endod* 2012;38:449-53
17. Scarparo RK, Dondoni L, Böttcher DE, et al. Response to intracanal medication in immature teeth with pulp necrosis: an experimental model in rat molars. *J Endod* 2011;37:1069-73
18. Kiatwateeratana T, Kintarak S, Piwat S, Chankanka O, Kamaolmatyakul S, Thearmontree A. Partial pulpotomy on caries-free teeth using enamel matrix derivative or calcium hydroxide: a randomized controlled trial. *Int End J* 2009;42:584-92.
19. Inaba H, Kawai S, Nakayama K, et al. Effect of enamel matrix derivative on periodontal ligament cells is diminished by *Porphyromonas gingivallis*. *J Periodontol* 2004;75:858-6.
20. Spahr A, Lyngstadaas SP, Boeckh C, et al. Effect of the enamel matrix derivative Emdogain® on the growth of periodontal pathogens in vitro. *J Clin Periodontol* 2002;29:62-72.
21. Cox CF, Hafez AA, Akimoto N, Otsuki M, Suzuki S, Tarim B. Biocompatibility of primer, adhesive and resin composite systems on non-exposed and exposed pulps of non-human primate teeth. *Am J Dent* 1998;11:55-63.
22. Hafez AA, Cox CF, Tarim B, Otsuki M, Akimoto M. An in vivo evaluation of hemorrhage control using sodium hypochlorite and direct pulp capping with one or two-component adhesive system in exposed nonhuman primate pulps. *Quint Int* 2002;33:261-72.

23. Cvek M, Cleaton-Jones PE, Austin JC, Andreasen JO. Pulp reactions to exposure after experimental crown fractures or grinding in adult monkeys. *J Endod* 1982;8:391-7.
24. Pitt Ford TR, Torabinejad M, Abedi HR, Bakland LK, Kariyawasam SP. Using mineral trioxide aggregate as a pulp capping material. *J Am Dent Assoc* 1996;127:1491-94.
25. Trope M, McDougal R, Lenvin L, May KN Jr, Swift EJ. Capping the inflamed pulp under different clinical conditions. *J Esthet Rest Dent* 2002;14:349-57.
26. Aguilar P, Linsuwanont P. Vital pulp therapy in vital permanent teeth with cariously exposed pulp: a systematic review. *J Endod* 2011;37:581-87.
27. Dammascke T. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. *Lab Anim* 201;44:1-6.
28. Seltzer S, Bender IB, Ziontz M. The dynamics of pulp inflammation: correlations between diagnostic data and actual histologic findings in the pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1963;16:846-71.
29. Nokhbehshaim M, Deschner B, Winter J, Bourauel C, Rath B, Jäger A, Jepsen S, Deschner J. Interactions of regenerative, inflammatory and biomechanical signals on bone morphogenetic protein-2 in periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*. 2011;46:374-81.
30. Karima MM, Van Dyke TE. Enamel matrix derivative promotes superoxide production and chemotaxis but reduces matrix metalloproteinase-8 expression by polymorphonuclear leukocytes. *J Periodontol*. 2012;83:780-6.

**Table 1. Main events observed following EMD and PGA infected pulp capping at the two experimental periods.**

	<b>EMD</b>	<b>EMD</b>	<b>PGA</b>	<b>PGA</b>
	<b>48 hours</b>	<b>30 days</b>	<b>48 hours</b>	<b>30 days</b>
<b>Hard tissue barrier</b>	0/6	0/6	0/6	0/6
<b>Inflammatory alterations</b>	6/6	1/6	6/6	0/6
<b>Degenerative alterations</b>	6/6	6/6	4/6	1/6
<b>Necrosis</b>	0/6	0/6	0/6	5/6
<b>Pulp abscesses</b>	3/6	1/6	6/6	0/6

### Figure Legends

**Figure 1.** Vascular congestion (arrows), limited inflammatory infiltrate (\*) and abscessed areas (AB) observed following EMD-capping at the 48 hours experimental period.

**Figure 2.** Pulp behavior 48-hours after PGA-capping control group. Pulp tissue showed Inflammatory infiltrate (\*) beneath a fiber condensation (FC) next to exposure site. Below the inflammatory front, vascular congestion and hyaline degeneration (arrows) could be observed.

**Figure 3.** Treatment outcomes at the 30 day experimental period. EMD capped pulp (A) showed widespread degenerative changes, showing reduced cellularity, fibrosis and absent odontoblastic layer. Some samples of PGA-capped group developed fully pulp necrosis (B).

Figure 1.

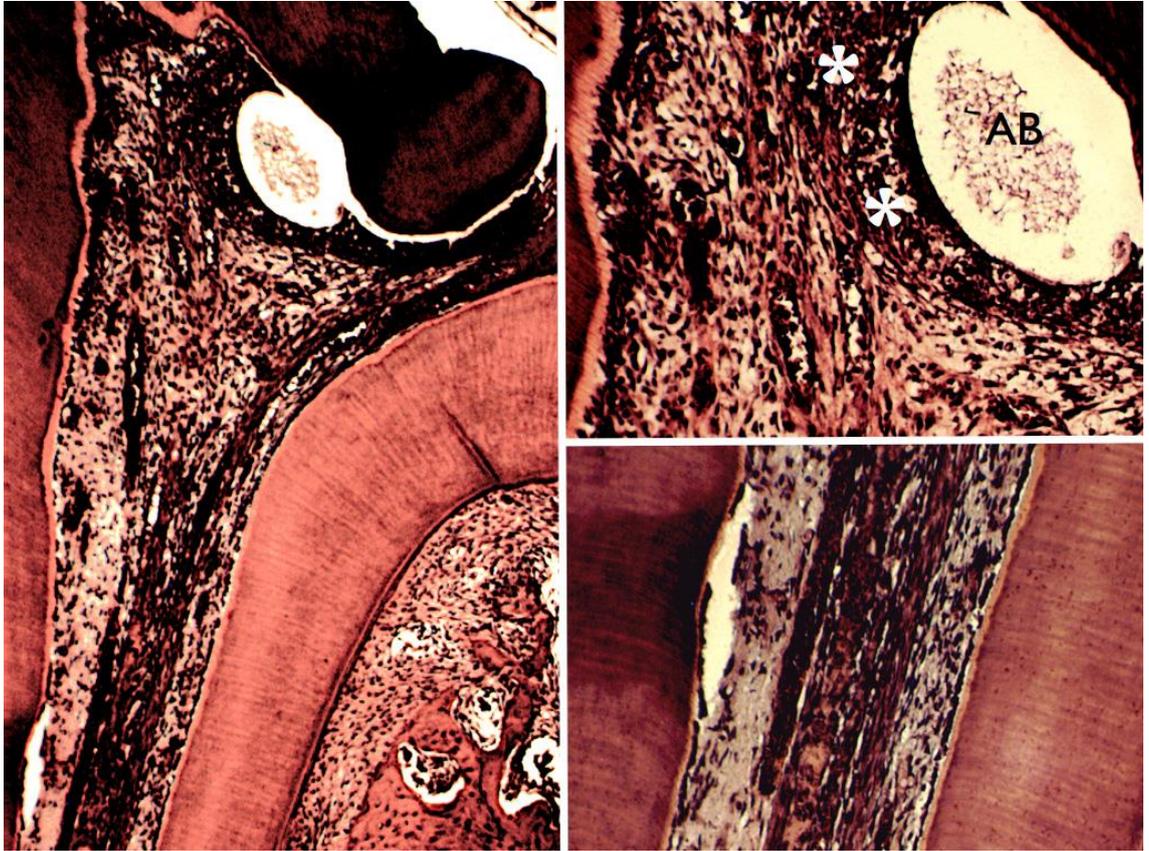


Figure 2

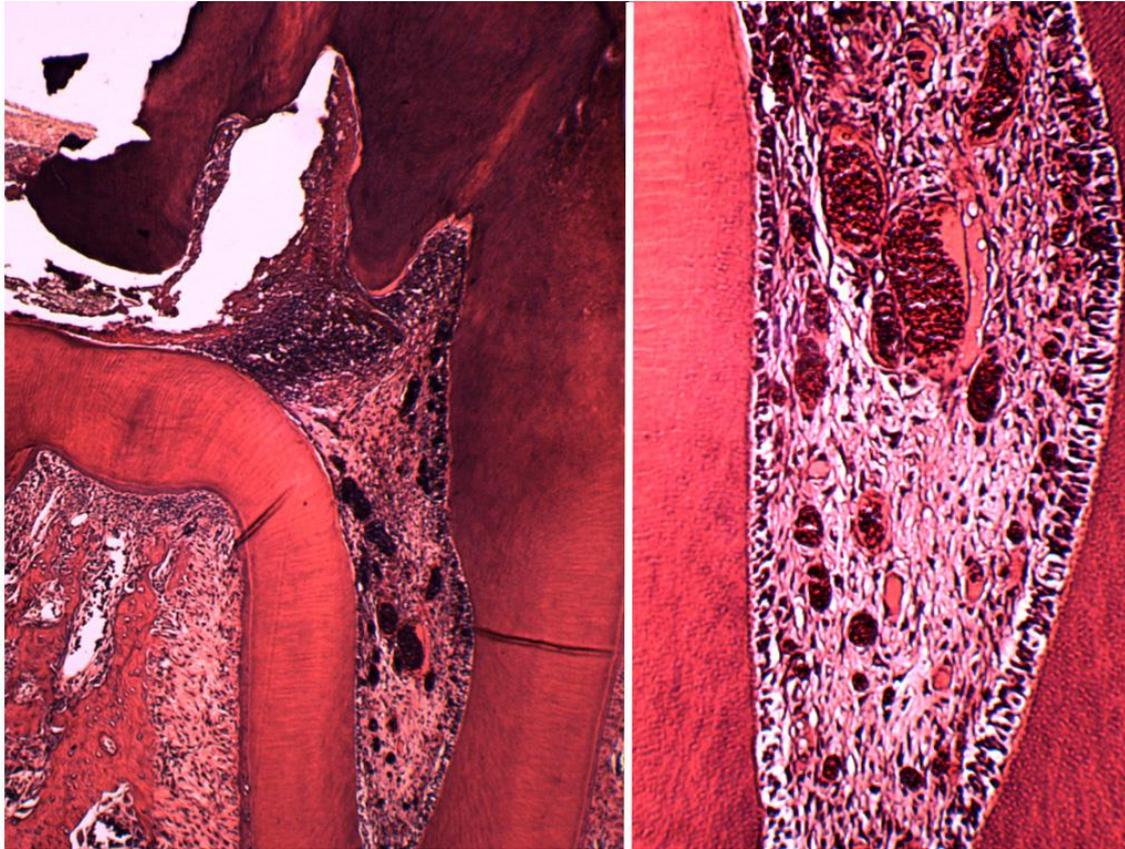
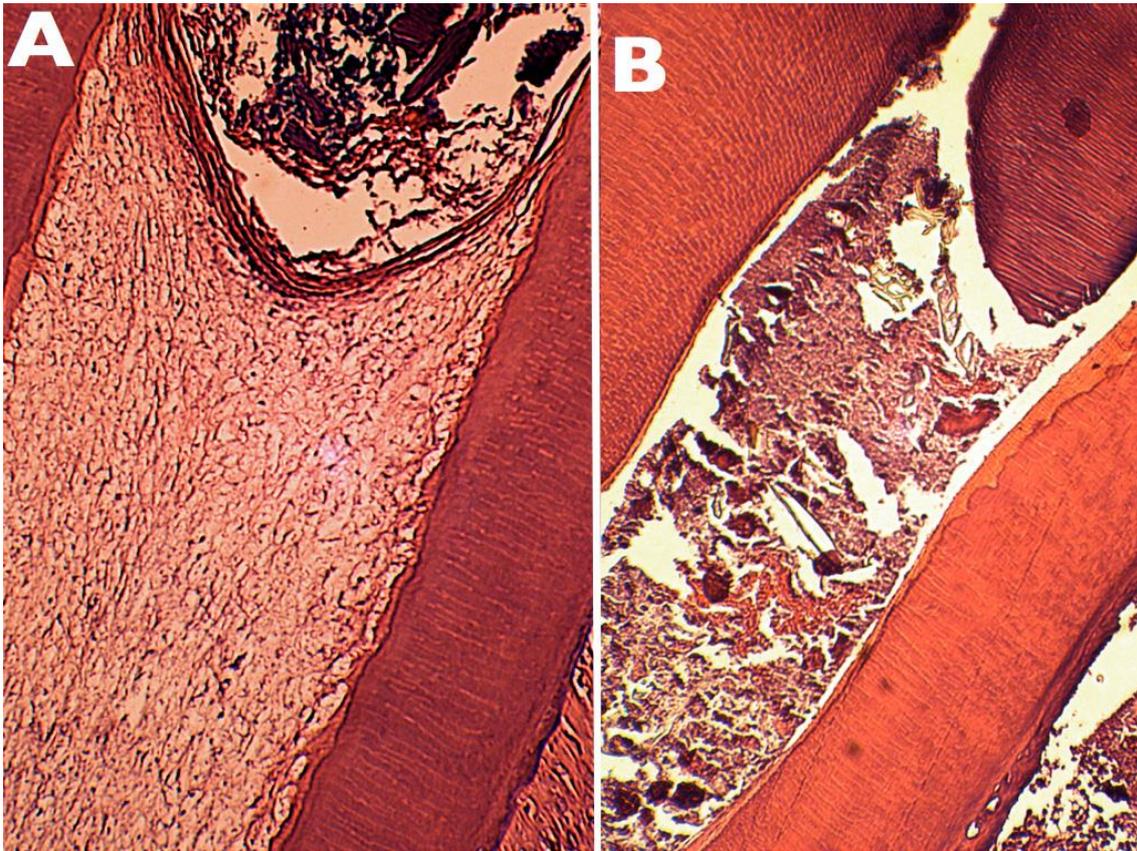


Figure 3



## DISCUSSÃO GERAL

Através deste estudo, buscou-se a compreensão dos processos biológicos pulpare frente a diferentes tipos de agressor e o desenvolvimento de abordagens terapêuticas racionais que preservassem a vitalidade pulpar. Para isso, avaliou-se, em ratos, um material alternativo para o tratamento de dentes com exposições pulpare e contaminação bacteriana.

Inúmeros estudos descreveram as similaridades morfológicas existentes entre os dentes de ratos e humanos (Shour & Van Dyke, 1934; Pinzon et al., 1967); estes dentes são similares histológica e fisiologicamente (Kozlov & Massler, 1960; Shour & Massler, 1962). Ainda, dentes de ratos têm sido utilizados para a avaliação de uma série de medicamentos (Hu et al., 1997) e condições especiais, incluindo respostas pulpare à injúrias (D'Souza et al., 1995). Incisivos e molares de ratos são diferentes, pois os primeiros diferem de dentes humanos por apresentarem crescimento contínuo, mas são um modelo válido para avaliar potenciais reações da polpa dental à moléculas bioativas (Hu et al., 1997; Sloan & Smith, 1999).

Sendo assim, o modelo de exposição pulpar em molares de ratos escolhido para este estudo já foi demonstrado anteriormente (Damascke, 2001; Igarashi et al., 2003) e apresenta vantagens técnicas e financeiras (Damascke, 2001), também proporciona maior rapidez no desenvolvimento de respostas biológicas, e apresenta microbiota oral bem como respostas do hospedeiro muito similares às observadas em humanos (Stashenko et al., 1994).

Algumas dificuldades técnicas precisaram ser superadas para a adequada execução dos procedimentos operatórios propostos. Devido à apresentação do Emdogain®-gel, o adequado selamento das cavidades após a sua aplicação para o período de trinta dias trouxe alguns desafios. Desgastes compensatórios das cúspides da face oclusal dos molares inferiores foram realizados, a fim de remover contatos prematuros e aumentar o diâmetro da cavidade para facilitar a colocação dos materiais. Alguns estudos que utilizaram o Emdogain® em humanos sugeriram o uso de um material

inerte intermediário, como discos de teflon (Olsson et al., 2005) ou selamento em camadas, com diferentes materiais restauradores provisórios (Kiatwateeratana et al., 2009). Além disto, o uso deste material associado a outros comumente utilizados como capeadores pulpare já foi demonstrado (Zhang & Yelik, 2010; Al-Hezaimi et al., 2011). Somado à isso, o posicionamento anatômico dos dentes exigiu o uso de um aparato desenvolvido anteriormente (Scaparo et al., 2011) para a manutenção da abertura de boca dos animais.

As exposições pulpares realizadas neste estudo foram finalizadas mecanicamente com o auxílio de uma sonda exploradora reta. Este procedimento proporcionou maior controle sobre o tamanho da exposição (Orhan et al., 2012).

A polpa dental possui a habilidade de formar pontes de dentina em após o capeamento pulpar direto (Schroder, 1985; Tziafas, 1994). Através da exposição pulpar, as células odontoblásticas primárias são injuriadas de forma irreversível (Murray et al., 2002). Por serem células diferenciadas, os odontoblastos não conseguem proliferar quando são permanentemente lesados. Entretanto, suposições a respeito da origem de células semelhantes às odontoblásticas, que secretam pontes de dentina em seguida a exposição pulpar, provam o contrário (Murray et al., 2002). Fitzgerald et al. (1990) relataram que novas células odontoblásticas podem derivar de outras populações celulares através de um processo de diferenciação.

A terapia pulpar conservadora, incluindo o capeamento pulpar direto, minimiza as injúrias causadas à polpa, protegendo-a dos efeitos tóxicos, químicos, bacteriológicos ou térmicos (Rutherford & Fitzgerald, 1995). Portanto, a terapia pulpar conservadora trata injúrias pulpares reversíveis, através do selamento pulpar e estímulo da formação de dentina terciária (Tziafas, 2000), que pode ser classificada como reacionária ou reparadora. A dentina reacionária, que é aquela formada pelos odontoblastos sobreviventes em resposta à estímulos de média intensidade, é de melhor qualidade que a dentina reparadora, que é formada pela geração de novos odontoblastos em resposta à estímulos de maior intensidade (Tziafas, 2000). Assim, o capeamento pulpar direto é recomendado após estímulos de média intensidade ou brandos, para indução de dentina terciária (Tziafas, 2000). A formação de dentina terciária é uma forma de

proteger a polpa dental. Portanto, a habilidade do dente em gerar essa dentina determina a sua sobrevivência.

Os resultados aqui apresentados mostraram que em polpas dentárias expostas às bactérias orais o EMD-gel não foi efetivo na formação de barreira de tecido duro. Além disso, alterações inflamatórias e degenerativas não foram diminuídas pelo uso deste biocomposto. Previamente foi demonstrado que o EMD foi efetivo na formação de dentina reparadora e pontes de tecido mineralizado em molares de ratos não infectados (Nakamura et al., 2002; Igarashi et al., 2003). Ademais, a formação de barreira de tecido duro em polpas de dentes humanos após capeamento pulpar direto também foi reportada (Olsson et al., 2005; Kiatwateeratana et al., 2009). Estes dados, em conjunto com o conhecido potencial do EMD em favorecer reparo apical e desenvolvimento radicular (Scarparo et al., 2012) e regeneração periodontal (Hammarstrom, 1997) seguida por inflamação desencadeada por bactérias levaram a crer que polpas poderiam responder positivamente a este composto proteico.

Provavelmente, nas situações citadas acima, o uso adjunto de instrumentação mecânica e substâncias químicas antimicrobianas exerceram algum efeito no resultado dos tratamentos. Aliás, o EMD, quando utilizado como medicação intracanal em dentes imaturos com necrose, foi aplicado posteriormente ao uso de solução de hipoclorito de sódio e intervenção mecânica na porção cervical do canal radicular (Scarparo et al., 2012). Ainda, previamente a aplicação do EMD em cirurgia periodontal, uma curetagem tecidual e raspagem da placa subgingival remanescente foi realizada (Hammarstrom, 1997).

Em apoio aos achados observados neste estudo, já foi reportado anteriormente que *p. gingivallis* parece diminuir o efeito do EMD na migração e proliferação das células do ligamento periodontal *in vitro* (Inaba et al., 2004), embora já tenha sido apresentado o seu potencial supressor ao crescimento de microorganismos (Spahr et al., 2002).

Os efeitos exercidos pelos microorganismos parecem ser amplificados na cavidade pulpar, uma vez que o tecido encontra-se confinado no interior de paredes

rígidas com limitado aporte sanguíneo, o que resulta em capacidade reduzida de reparo quando comparada à outros tecidos, não confinados.

Quanto ao emprego de soluções desinfetantes previamente ao uso de materiais protetores pulpares, alguns autores sugerem o uso de peróxido de hidrogênio, clorexidina ou variadas concentrações de hipoclorito de sódio para alcançar a hemostase (Cox et al., 1998; Hafez et al., 2002). Entretanto, no presente estudo estas substâncias foram evitadas a fim de permitir a avaliação os efeitos do EMD por si só. Além disso, a desinfecção química é limitada devido às propriedades das soluções em provocar respostas pulpares, o que influencia na indicação do uso de solução salina para o adequado controle de sangramento, como recomendado em outros estudos (Cvek et al., 1982; Pitt Ford et al., 1996).

A falta de atividade antimicrobiana efetiva do EMD pode exercer influência negativa no que diz respeito ao controle da infiltração bacteriana pós-operatória através do material selador coronário (Al-Hezaimi et al., 2011). Por outro lado, mesmo quando um material conhecido por possuir atividade antimicrobiana, como o hidróxido de cálcio, é utilizado, o resultado do capeamento pulpar em tecidos expostos por cárie é comprometido (Ward, 2002; Swift, Trope & Ritter, 2003).

Neste sentido, outros protocolos para a terapia pulpar em dentes vitais devem ser considerados com o intuito de proporcionar aumento da capacidade de reparo pulpar. Uma das possíveis alternativas é remover maiores quantidades de tecido pulpar coronário, objetivando eliminar o tecido potencialmente contaminado. Em suporte á isto, as taxas de sucesso observadas em capeamento pulpar direto são duvidosas, enquanto que aquelas observadas em tratamentos que promovem uma remoção com maior margem de segurança do tecido pulpar, como por exemplo, pulpotomia parcial ou total, apresentam maiores taxas de sucesso (Trope et al., 2002; Aguilar & Linsuwanont, 2011).

Entretanto, o modelo experimental utilizado neste estudo apresenta algumas limitações para testar este tipo de protocolo, considerando o reduzido tamanho dos

molares dos ratos e a dificuldade em se padronizar a quantidade de tecido pulpar removido.

Os achados histológicos apresentados neste estudo mostram que, independente do grupo e, principalmente no primeiro período experimental, o processo inflamatório ocorreu concomitantemente aos eventos degenerativos, como já demonstrado anteriormente (Seltzer, Bender & Ziontz, 1963). Além do processo inflamatório, estas características certamente influenciaram de forma negativa nos resultados não favoráveis do protocolo de tratamento testado. Geralmente, o EMD apresenta resultados similares aos do PGA, exceto pela progressão mais rápida do processo de necrose no grupo controle, como demonstrado em algumas amostras no segundo período experimental.

Relatou-se que o EMD diminui a expressão de IL-8 e IL 1 $\beta$  (Nokhbehshaim et al., 2011) e também da metaloproteinase-8 (Karima & Van Dyke, 2012), o que pode ter influenciado na velocidade de progressão do dano pulpar, bem como na prevenção da amplificação do processo inflamatório. Por outro lado, os eventos degenerativos mostrados aqui devem ser considerados como danos irreversíveis, uma vez que inviabilizam o reparo deste tecido.

Portanto, diferentemente do que já foi demonstrado em polpas não-infectadas (Nakamura et al., 2001; Nakamura et al., 2002), o EMD não foi capaz de promover adequado reparo dos tecidos, entendendo que a presença de contaminação bacteriana parece ter um papel definitivo no destino do tecido pulpar capeado com EMD.

## CONCLUSÕES

- O presente estudo sugere que o EMD não foi efetivo na formação de barreira de tecido duro nas condições avaliadas, bem como no controle da progressão do processo inflamatório no tecido pulpar.
- A presença de bactérias pareceu influenciar de forma negativa a eficácia do EMD no tratamento conservador da polpa dental. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliação do uso do EMD nas condições aqui propostas, talvez com o uso de um material selador intermediário ou a associação com outros compostos, como o MTA e o hidróxido de cálcio, a fim de facilitar o adequado selamento coronário.
- Ainda, outros protocolos para tratamento conservador da polpa dental, como a pulpotomia total ou parcial, podem ser realizados a fim de melhorar a eficácia desta terapia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ward J. Vital pulp therapy in cariously exposed permanent teeth and its limitations. *Aus Endod J* 2002;28:29-37.
2. Engstrom B, Lundberg M. The correlation between positive culture and the prognosis of root canal therapy after pulpectomy. *Odontol Revy* 1965;16:193-203.
3. Kojima K, Inamoto K, Nagamatsu K, et al. Success rate of endodontic treatment of teeth with vital and nonvital pulps: A meta-analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:05-9.
4. Ng YL, Mann V, Rahbaran S, Lewsey J, Gulabivala K. Outcome of primary root canal system: Systematic review of the literature – part 2: Influence of clinical factors. *Int Endod J* 2008;41:426-31.
5. Aguilar P, Linsuwanont P. Vital pulp therapy in vital permanent teeth with cariously exposed pulp: a systematic review. *J Endod* 2011;37(5):581-7.
6. Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13(2):171-83.
7. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20:340-9.
8. Goldberg M, Farges JC, Lacerda-Pinheiro S, Six N, Jegat N, Decup F, et al. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacol Res* 2008;58(2):137-47.

9. Hahn CL, Liewehr FR. Innate immune responses of the dental pulp to caries. *J Endod* 2007;33(6):643-51.
10. Pisterna GV, Siragusa M. CD44 Presence in inflamed pulp tissue. *J Endod* 2007;33(10):1203-7.
11. Trope M. Regenerative potential of dental pulp. *Pediatr Dent* 2008;30(3):206-10.
12. Asgary S, Eghbal MJ, Parirokh M, Ghanavati F, Rahimi H. A comparative study of histologic response to different pulp capping materials and a novel endodontic cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106(4):609-14.
13. Tziafas D. The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration. *Caries Res* 2004;38(3):314-20.
14. Barthel CR, Rosenkranz B, Leuenberg A, Roulet JF. Pulp capping of carious exposures: treatment outcome after 5 and 10 years: a retrospective study. *J Endod* 2000;26(9):525-8.
15. Tziafas D, Pantelidou O, Alvanou A, Belibasakis G, Papadimitriou S. The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short-term capping experiments. *Int Endod J* 2002;35(3):245-54.
16. Bogen G, Kim JS, Bakland LK. Direct pulp capping with mineral trioxide aggregate: an observational study. *J Am Dent Assoc* 2008;139(3):305-15; quiz 305-15.
17. Al-Hiyasat AS, Barrieshi-Nussair KM, Al-Omari MA. The radiographic outcomes of direct pulp-capping procedures performed by dental students: A retrospective study. *J Am Assoc* 2003;137:1699-705.

18. Konche A. Treatment of deep carious lesions. *Int Dent J* 1970;20:338-43.
19. Seltzer S, Bender IB, Ziontz M. The dynamics of pulp inflammation: Correlations between diagnostic data and actual histologic findings in the pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1963;16:846-71.
20. Mitchell DF, Tarplee RE. Painful pulpitis: A clinical and microscopic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1960;13:1360-70.
21. Garfunkel A, Sela J, Ulmanky M. Dental pulp pathosis: Clinicopathologic correlations based on 109 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1973;35:110-7.
22. Matsuo T, Nakanishi T, Shimizu H, Ebizu S. A clinical study of direct pulp capping applied to carious-exposed pulps. *J Endod* 1996;22:551-6.
23. Teixeira LS, Demarco FF, Coppola MC, Bonow ML. Clinical and radiographic evaluation of pulpotomies performed under intrapulpal injection of anaesthetic solution. *Int Endod J* 2001;34:440-6.
24. Accorinte ML, Loguercio AD, Reis A, Costa CA. Response of human pulps capped with different self-etch adhesive systems. *Clin Oral Investig* 2008;12(2):119-27.
25. Nair PN, Duncan HF, Pitt Ford TR, Luder HU. Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with mineral trioxide aggregate: a randomized controlled trial. *Int Endod J* 2008;41(2):128-50.

26. Accorinte ML, Loguercio AD, Reis A, Bauer JR, Grande RH, Murata SS, et al. Evaluation of two mineral trioxide aggregate compounds as pulp-capping agents in human teeth. *Int Endod J* 2009;42(2):122-8.
27. Accorinte ML et al. Evaluation of Mineral Trioxide Aggregate and Calcium Hydroxide Cement as pulp-capping agents in human teeth. *J Endod* 2008;34(1):1-6.
28. Holland R, Filho JA, de Souza V, et al. Mineral trioxide aggregate repair of lateral root perforations. *J Endod* 2001;27:281-4.
29. Arens DE, Torabinejad M. Repair of furcal perforations with mineral trioxide aggregate: two cases report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;82:84-8.
30. Felipe WT, Felipe MC, Rocha MJ. The effect of mineral trioxide aggregate on the apexification and periapical healing of teeth with incomplete root formation. *Int Endod J* 2006;39-2-9.
31. Torabinejad M, Rastegar AF, Kettering JD, Pitt Ford TR. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end filling. *J Endod* 1995;21:109-12.
32. Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root-end filling material. *J Endod* 1993;19:591-5.
33. Ford TR, Torabinejad M, Abedi HR, et al. Using mineral trioxide aggregate as a pulp capping material, *J Am Assoc* 1996;127:1491-4.
34. Faraco IM Jr, Holland R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. *Dent Traumatol* 2001;17:163-6.

35. Decup F, Six N, Palmier B, Buch D, Lasfargues JJ, Salih E, et al. Bone sialoprotein induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. *Clin Oral Investig* 2000;4(2):110-9.
36. Igarashi R, Sahara T, Shimizu-Ishiura M, Sasaki T. Porcine enamel matrix derivative enhances the formation of reparative dentine and dentine bridges during wound healing of amputated rat molars. *J Electron Microsc (Tokyo)* 2003;52(2):227-36.
37. Waynforth H.A. FPA. *Experimental and Surgical Techniques in the Rat*. 2 ed. London: Elsevier; 2004.
38. Motulsky H. *Sample Size Calculation*. In: *Intuitive Biostatistics*. 1 ed. New York: Oxford University Press; 1995.
39. Graeme A. GKC. *Paraffin Processing of Formalin-Fixed Samples*. In: Bancroft JD SA, editor. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4<sup>th</sup> ed. London: Churchill Livingstone; 1996. p. 47-79.
40. Assed S; Da Silva LAB. *Materiais obturadores de canais radiculares* In: Leonardo M.R. *Endodontia tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos*. São Paulo: Artes Médicas, 2005. Cap.3, p. 49-66.
41. Camp JH. *Tratamento Endodôntico em Odontopediatria* In: Cohen S; Burns RC. *Caminhos da Polpa*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap.22, p.680-715.
42. Igarashi R; Sahara T; Shimizu-Ishiura M; Sasaki T. Porcine enamel matrix derivative enhances the formation of reparative dentine bridges during wound healing of amputated rat molars. *J Electron Microsc* 2003; 52(2):227-236.

43. Kiatwateeratana S et al. Partial pulpotomy on caries-free teeth using enamel matrix derivative or calcium hydroxide: a randomized controlled trial. *Int Endod J* 2009; 42:584-592.
44. Olsson H et al. Dental pulp capping: effect of Emdogain Gel on experimentally exposed human pulps. *Int Endod J* 2005, 38:186-194.
45. Al-Hezaimi K et al. A hybrid approach to direct pulp capping by using Emdogain with a capping material. *J Endod* 2011; 37(5):667-672.
46. Min SK; Yang SH; Kim EC. The combined effect of mineral trioxide aggregate and enamel matrix derivative on odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. *J Endod* 2009; 35(6):847-851.
47. Hammarstrom L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Period* 1997;24(8):658-68.
48. Heijl L; Heden G; Svardstrom G; Ostgren A. Enamel matrix derivative (Emdogain) in the treatment of intrabony periodontal defects. *J Clin Period* 1997; 24(8): 705-14.
49. Nakamura Y et al. The induction of reparative dentine by enamel proteins. *Int Endod J* 2000; 35(5):407-17.
50. Nakamura Y et al. Immunohistochemical characterization of rapid dentin formation induced by enamel matrix derivative. *Calcified Tissue Int* 2004; 75(3):243-52.
51. Pontoriero R; Wennstrom J; Ritchie J. The use of barrier membranes and enamel matrix proteins in the treatment of angular bone defects. A prospective controlled clinical study. *J Clin Period* 1999; 26: 833-40.

52. Veis A; Tompkins K; Alvares K et al. Specific amelogenin gene splice products have signaling effects on cells in culture and in implants in vivo. *J Biol Chem* 2000; 275:41263-72.

53. Stashenko P; Wang CY, Tani-Ishii N; Yu, SM. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994,78:494-502