

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL: MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENDODONTIA**

**EFEITO DA RESOLVINA E1 (RvE1) - MEDIADOR LIPÍDICO
ANTIINFLAMATÓRIO E PRÓ-RESOLUÇÃO - NA POLPA DENTAL DE
RATOS INFECTADA APÓS EXPOSIÇÃO AO MEIO ORAL**

***EFFECT OF RESOLVIN E1 (RvE1) – AN ANTI-INFLAMMATORY AND PRO-
RESOLUTION LIPID MEDIATOR – ON INFECTED RAT PULPS EXPOSED
TO THE ORAL ENVIRONMENT***

LENARA DONDONI

PORTO ALEGRE

2011

Lenara Dondoni

**EFEITO DA RESOLVINA E1 (RvE1) - MEDIADOR LIPÍDICO
ANTIINFLAMATÓRIO E PRÓ-RESOLUÇÃO - NA POLPA DENTAL DE
RATOS INFECTADA APÓS EXPOSIÇÃO AO MEIO ORAL**

***EFFECT OF RESOLVIN E1 (RvE1) – AN ANTI-INFLAMMATORY AND PRO-
RESOLUTION LIPID MEDIATOR – ON INFECTED RAT PULPS EXPOSED
TO THE ORAL ENVIRONMENT***

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Odontologia da Pontifícia
Universidade Católica do Rio
Grande do Sul como requisito final
para obtenção do título de Mestre
em Odontologia, área de
concentração em Endodontia.

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

Orientador: Prof. Dr. Eraldo Luiz Batista Júnior

PORTO ALEGRE

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

D679e Dondoni, Lenara

Efeito da Resolvina E1 (RvE1) - mediador lipídico antiinflamatório e pró-resolução - na polpa dental de ratos infectada após exposição ao meio oral / Guilherme Picolli Bernd. – Porto Alegre, 2011.

46 f.: il. tab.

Dissertação (Mestrado em Odontologia. Área de concentração: Endodontia) – Faculdade de Odontologia, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Eraldo Luiz Batista Júnior

1. Odontologia. 2. Endodontia. 3. Polpa Dentária. 4. Inflamação/ terapia. I. Dondoni, Lenara. II. Batista Júnior, Eraldo Luiz. III. Título.

CDD 617.634

Bibliotecária Responsável: Elisete Sales de Souza, CRB 10/1441

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais volta ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Nelson Dondoni** (*in memoriam*) e **Maria Santin Dondoni**, pelo amor incondicional e pela dedicação de suas vidas à educação e formação profissional de seus filhos.

Ao meu companheiro de longa data, **Diego Fernandes Triches**, pelo incentivo na busca da realização de meus sonhos, pelo compartilhamento de experiências vividas e pela oportunidade de crescimento profissional.

Ao meu irmão, **Marilson Dondoni**, pelo zelo, carinho e apoio sempre a mim dispensados. Obrigada pela disponibilidade e compartilhamento de experiências de vida e profissionais.

À **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)**, e à **Faculdade de Odontologia**, na pessoa de seu Diretor, professor **Marcos Túlio Mazzini Carvalho**, por mais esta oportunidade de crescimento em minha vida.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, professor **José Antônio Poli de Figueiredo**, pela oportunidade de realização deste Mestrado e pelo aprendizado em Endodontia.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela oportunidade e incentivo financeiro.

Ao meu orientador, professor **Eraldo Luiz Batista Júnior**, pela orientação no desenvolvimento deste trabalho que me permitiu grandioso aprendizado e crescimento. Obrigada pelo compartilhamento de conhecimentos e pelo incentivo, pelo entusiasmo, seriedade e competência na condução da pesquisa científica.

Ao professor **Thomas E. Van Dyke**, pela doação da Resolvina E1, permitindo a realização deste estudo.

À amiga **Roberta Kochenborger Scarparo**, por todos os ensinamentos técnicos e científicos. Pelo apoio, dedicação, incentivo e paciência. Pela maravilhosa oportunidade de te conhecer, conviver e aprender contigo.

À professora **Maria Martha Campos**, pela disponibilização do Laboratório de Toxicologia Pré-Clínica e por todo apoio e ensinamentos para a realização da pesquisa científica com animais.

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

A **Tiago Giuliani**, pelos ensinamentos e empenho no processamento histológico das amostras deste trabalho.

A **Juliano Soares**, pelas orientações quanto aos cuidados com os animais e utilização do vivário.

À amiga **Daiana Böttcher**, pelo compartilhamento de experiências e pelo auxílio técnico.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)**, pela disponibilização de seu microscópio para a leitura das lâminas deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, em especial aos professores que fizeram parte do corpo docente da Endodontia: **José Antônio Poli de Figueiredo, Eraldo Luiz Batista Júnior, Maria Martha Campos, João Batista Blessmann Weber, Patrícia Poli Kopper e Fabiana Vier Pelisser**, pelo aprendizado proporcionado em suas aulas.

Aos colegas do Mestrado em Endodontia: **Matheus Albino Souza, Caroline Marca, Cláudia Wagner, Janaína Zechin, Carina Staudt Follmann,**

Grasiela Sabrina Longhi Grundling, Kathrein Tapia da Silva, Pabla Secchi e aos colegas do Doutorado em Endodontia: **Charles da Cunha Pereira, Carlos Frederico Wolle, Roberta Kochenborger Scarparo, Larissa Magnus Klassmann, Alessandra César Trindade e Andréa Longoni Fredrich**. Pela maravilhosa convivência nesses dois anos que se passaram.

Aos **funcionários da PUCRS** que de alguma forma participaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos os **amigos e familiares** que demonstraram interesse e preocupação, se prontificaram a ajudar e torceram muito por mim e pela realização deste trabalho.

“A todos vocês o meu carinho e agradecimento, vocês fazem parte deste trabalho, sem sua ajuda ele não teria sido realizado”.

ÍNDICE

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 ETIOPATOLOGIA PULPAR.....	11
1.2 TRATAMENTO CONSERVADOR DA POLPA – CAPEAMENTO PULPAR DIRETO.....	12
1.3 RESOLUÇÃO DA INFLAMAÇÃO – MEDIADORES LIPÍDICOS	14
2. ARTIGO CIENTÍFICO	17
3. DISCUSSÃO	37
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
6. ANEXO	47

RESUMO

Diferentes abordagens têm sido advogadas para implementação do tratamento conservador do tecido pulpar, usualmente empregando o controle da inflamação e a aplicação de compostos com potencial terapêutico sobre a polpa. A Resolvina E1 (RvE1) é um mediador lipídico capaz de regular rotas inflamatórias que não envolvem o bloqueio de intermediários enzimáticos. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito tópico da RvE1 sobre polpas dentais expostas ao meio oral. Para esta finalidade, 42 ratos machos *Wistar* ($n = 6$ por grupo/período), tiveram as polpas dos primeiros molares inferiores direitos acessadas e deixadas expostas ao meio oral por 24 horas. Após este período, medicação tópica com etanol 0.1% (veículo da RvE1), RvE1 ou corticosteróide foi aplicada sobre o tecido pulpar e os dentes foram selados com amálgama de prata. Os efeitos dos protocolos testados foram avaliados histologicamente após 24 e 72 horas. Dentes intactos foram utilizados como referência para análise das alterações verificadas nos grupos experimentais. RvE1 induziu significativa redução e contenção da inflamação com danos pulpares menos extensos em comparação ao etanol 0.1% ou corticosteróide ($P < 0.05$). Nenhum dos fármacos testados promoveu características pulpares idênticas às observadas nos dentes intactos ($P < 0.01$). Os resultados apresentados revelaram a função protetora da RvE1 na inflamação da polpa, sugerindo que ela possa ser candidata para uma nova estratégia terapêutica para a preservação de sua vitalidade.

Palavras Chave: Endodontia, polpa dental, inflamação, resolvina, tratamento conservador da polpa dental.

ABSTRACT

Different approaches have been advocated for implementation of conservative treatment of the pulp tissue, usually employing inflammation control and the application of compounds with therapeutic potential on the pulp. The Resolvin E1 (RvE1) is a lipid mediator capable of regulating inflammatory routes that do not involve the blockage of enzymatic intermediates. The aim of this study was to evaluate the effect of the topical application of RvE1 on dental pulps exposed to the oral environment. To this end, 42 male *Wistar* rats (n=6 per group/period) had the pulps of the right mandibular first molars assessed and then left exposed to the oral environment for 24 hours. After this period, topical medication either with 0.1% ethanol (vehicle of RvE1), RvE1 or a corticosteroid was applied onto the pulp tissue, and the teeth were then sealed with silver amalgam. The effects of the tested protocols were assessed by histology after 24 and 72 hours. Untouched teeth were used as reference for relative analysis and grading of the alterations observed in test groups. RvE1 induced significant reduction and containment of pulp inflammation with less extensive damage compared to either 0.1% ethanol or corticosteroid ($P<0.05$). Within the conditions tested none of the tested drugs promoted identical pulp tissue features compared to the observed in untouched teeth ($P<0.01$). The results presented herein have uncovered protective roles for RvE1 in pulp inflammation, suggesting that it may be a candidate for a novel therapeutic strategy for preservation of its vitality.

Keywords: Endodontics, dental pulp, inflammation, resolvin, conservative treatment of dental pulp.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Etiopatologia Pulpar

A Endodontia objetiva o estudo, a prevenção e o 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 erradicada 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 (1).

Estudos confirmaram o papel das bactérias na etiopatologia das doenças pulpares e perirradiculares; por exemplo, polpas dentais de ratos mantidos em condições convencionais e *germ-free* foram expostas ao meio oral e observadas histologicamente. Enquanto que nos animais mantidos em ambiente séptico desenvolveu-se inflamação severa ou necrose pulpar associadas 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 (2).

A polpa dental inclui elementos como nervos, tecido vascular, fibras do tecido conjuntivo, matriz extracelular, fluido intersticial, odontoblastos, fibroblastos e células imunocompetentes. Ela se torna inflamada em resposta à

infecção bacteriana a partir de cáries, trauma ou, por alguma razão iatrogênica. Estando a dentina amplamente invadida por bactérias, a polpa reage através da diminuição da permeabilidade dentinária, formação de dentina ou reação inflamatória e imune (1,3-4). O processo inflamatório desse tecido é extremamente complexo, sendo as mudanças na polpa dental acompanhadas pela produção de ampla variedade de mediadores pró-inflamatórios, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de leucócitos, que são recrutados por mediadores endógenos como cininas, prostaglandinas e neuropeptídeos (4-5).

O tecido pulpar é equipado para montar uma resposta inata às bactérias; não sendo eficaz essa resposta na eliminação do agressor, a resposta imune adaptativa é ativada (3-4). A própria defesa do hospedeiro pode levar a uma exacerbação da inflamação, resultado em aumento de edema e pressão intrapulpar, que se tornam lesivos para a polpa que está inserida em uma cavidade rígida (3-5). Polpas inflamadas podem se recuperar, contanto que a maioria dos agentes infecciosos sejam removidos suficientemente cedo, a ponto de não induzirem alterações inflamatórias que levem ao dano irreversível do tecido (4).

1.2 Tratamento conservador da polpa – Capeamento pulpar direto

A terapia pulpar conservadora objetiva o tratamento do dano reversível com manutenção da vitalidade e função (6-7). Ela pode incluir duas abordagens terapêuticas: capeamento pulpar indireto, em casos de cavidades dentinárias profundas e capeamento pulpar direto/pulpotomia, em casos de polpas expostas. O sucesso da terapia pulpar conservadora depende do tipo, localização e extensão do dano, idade do dente, modalidade de tratamento,

material capeador e integridade da restauração cavitária (8-9). Conceitualmente, capeamento pulpar direto é o método de tratamento no qual a polpa dental exposta é coberta com material que a protege de danos adicionais e permite sua cicatrização e reparo (10).

Enquanto a polpa inflamada não exposta por cárie ou trauma apresenta potencial de reparo, o tratamento da polpa inflamada exposta, principalmente por cárie, continua sendo motivo de controvérsia (9). Produtos bacterianos induzem a inflamação pulpar e acionam respostas flogísticas capazes de impedir a instalação de mecanismos de reparo da polpa (11). Nesse contexto, polpas jovens têm maior potencial de reparo, o que pode ser atribuído à presença de forame apical grande e maior vascularização da polpa, por onde células imunes ativadas podem aumentar as chances de reparo e intensificar a manutenção da vitalidade pulpar (9,11).

Autores (8-9,11) consideraram importante o diagnóstico de pulpíte reversível antes do capeamento pulpar direto de polpas expostas por cavidade profunda de cárie, para ter sucesso como resultado; porém, um diagnóstico pulpar definitivo é frequentemente de difícil estabelecimento (11). Assim, apesar da dificuldade em se encontrar um consenso na literatura sobre a taxa de sucesso do capeamento pulpar direto nestas situações, o tempo de observação, os critérios de avaliação e, a condição pulpar antes do capeamento, parecem ter um papel decisivo (8, 11-12).

Inúmeros materiais têm sido utilizados como capeadores pulpares diretos (6,12), contudo, algumas preocupações têm surgido quanto ao seu uso e novos materiais têm sido testados como alternativa aos já existentes (3,11,13-15). Devido às suas propriedades antiinflamatórias, os corticosteróides

tópicos têm sido utilizados no capeamento pulpar indireto (16) e direto (17) para reduzir a dor pós-operatória e para auxiliar na cicatrização do tecido pulpar (16-17). Porém, quando utilizados por longos períodos e na presença de microrganismos, podem causar efeitos deletérios à polpa: atraso na cicatrização dos tecidos, inibição da síntese de colágeno e formação de barreira de tecido duro incompleta e irregular (17-18). Estes resultados estão provavelmente relacionados com o mecanismo de ação dos corticosteróides, que se baseia na redução da conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas e leucotrienos, através do bloqueio da enzima fosfolipase A2 (19). Resultados recentes indicam que, após as fases iniciais do processo inflamatório, o ácido araquidônico origina lipoxinas protetoras que são agonistas na ativação do término da inflamação e promoção da resolução (20).

1.3 Resolução da inflamação – Mediadores Lipídicos

Alterações nos tecidos do hospedeiro causadas por microrganismos, dano tecidual ou trauma cirúrgico, levam à ativação de rotas pró-inflamatórias com consequente liberação de mediadores flogísticos quimiotáticos para neutrófilos (20). No local do dano, neutrófilos fagocitam microrganismos e *debris* celulares. Grânulos dispersos em seu citoplasma armazenam enzimas líticas que produzem destruição de bactérias, mas também têm a capacidade de desorganizar os tecidos. Além desses, neutrófilos produzem espécies reativas de oxigênio (ROS), subprodutos oxidantes como o superóxido, altamente deletérios a bactérias que resultam da ativação do complexo enzimático NADPH oxidase (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase). Esses mecanismos, uma vez ativados e tendo seus produtos inadvertidamente acessado o meio extracelular, causam danos ao tecido local

e amplificação dos sinais da inflamação aguda (21). Mediadores endógenos também podem conduzir ao dano tecidual por recrutamento excessivo de neutrófilos que sustentam a resposta inflamatória pela liberação de mais grânulos com conteúdo lítico e geração de outros mediadores químicos (22).

Após iniciada, a inflamação aguda tem vários possíveis destinos, incluindo a progressão à fibrose tecidual crônica ou convergindo ao resultado ideal de completa resolução do processo inflamatório. A resolução da inflamação é a redução ou remoção de leucócitos do local da inflamação, habilitando o retorno à homeostasia e reparo tecidual (20,23). Assim, esse processo não se restringe ao mero término passivo da inflamação, mas a um processo ativo de caráter bioquímico e metabólico. Ela é rapidamente iniciada, após alterações agudas, por rotas celulares que ativam a biossíntese de mediadores lipídicos endógenos com ação dual, antiinflamatória e pró-resolução, como as lipoxinas, resolvinas e protectinas (21-22,24). Lipoxinas são biossintetizadas a partir do ácido araquidônico pela ação da lipoxigenase e resolvinas e protectinas são biossintetizadas a partir do precursor ácido graxo poliinsaturado ômega-3 (PUFA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) (23).

Resolvinas são assim chamadas por serem potentes reguladoras da resolução da inflamação. No sítio inflamado, elas interrompem a infiltração de neutrófilos, estimulam o recrutamento não flogístico de monócitos e ativam a fagocitose de microrganismos e células apoptóticas por macrófagos (24). Elas apresentam duas formas estruturais, a série E (derivada do EPA) e a série D (derivada do DHA). Presentemente, a Resolvina E1 (RvE1) é a forma com mais documentação na literatura, sendo formada pela conversão do EPA em 18R-

hidroperoxieicosapentaenóico (18R-HPEPE) que libera 18R-hidroxeicosapentaenóico (18R-HEPE), rapidamente transformado pela ação da lipoxigenase-5 de neutrófilos humanos (20,24). A RvE1 parece ter um amplo espectro de atuação, seus efeitos benéficos são observados em várias situações médicas (25-28) e na doença periodontal (29-30), nesta com eficaz bloqueio da perda óssea modulada por patógenos orais em modelo animal.

O presente estudo teve como proposta a busca em se obter um composto que atue na resolução da inflamação do tecido pulpar infectado, possibilitando o retorno à homeostasia e a manutenção da vitalidade pulpar. 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 com polpa exposta por cavidade profunda de cárie reside na dificuldade de um diagnóstico preciso quanto à condição pulpar de inflamação reversível e irreversível, e na falta de um composto ideal capaz de circunscrever o processo inflamatório, minimizando ou eliminando o dano pulpar. A RvE1, graças às suas propriedades biológicas já demonstradas, foi empregada nesse estudo como candidata a este composto, que poderia mudar conceitos vigentes sobre a resolução da inflamação pulpar em tratamentos conservadores da polpa, estando esta infectada.

2. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo científico escrito conforme as normas do periódico Journal of Endodontics, qualis A1 e fator de impacto 2.953.

EFFECT OF RESOLVIN E1 (RvE1) – AN ANTI-INFLAMMATORY AND PRO-RESOLUTION LIPID MEDIATOR – ON INFECTED RAT PULPS EXPOSED TO THE ORAL ENVIRONMENT

Lenara Dondoni, DDS¹, Roberta Kochenborger Scarparo, PhD¹, Alpdogan Kantarci, PhD², José Antônio Poli de Figueiredo, PhD¹, Thomas E. Van Dyke, PhD², Eraldo Luiz Batista Júnior, PhD¹

1. Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil
2. The Forsyth Institute, Cambridge, MA, USA

Corresponding Author:

Eraldo L. Batista Jr. DDS, MSc, DSc

Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 6

Cep.: 90619-900

Porto Alegre - RS - Brazil

(51) 3320-3562/3573

(51) 3320-3626/3609

eraldo.batista@pucrs.br

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported, in part, by grants from CAPES, a Brazilian Governmental Institution. Eraldo L. Batista Jr. is a National Council of Research (CNPq) Career Awardee. **Conflict of interests:** Dr. Van Dyke holds patents at Boston University that are subject to royalty payments.

Abstract

Introduction: The aim of this study was to evaluate the effect of the topical application of Resolvin E1 (RvE1) on dental pulps exposed to the oral environment.

Methods: 42 male *Wistar* rats (n=6 per group/period) had the dental pulps of the right mandibular first molars assessed and then left exposed to the oral environment for 24 hours. After this period, topical medication either with 0.1% ethanol (vehicle of RvE1 - positive control), RvE1 or a corticosteroid was applied onto the pulp tissue, and the teeth were sealed with silver amalgam. The effects of the tested protocols were histologically evaluated after 24 and 72 hours. Untouched teeth were used as a negative control.

Results: RvE1 induced significant reduction and containment of pulp inflammation with less extensive damage compared to either 0.1% ethanol or corticosteroid ($P<0.05$). None of the tested drugs promoted identical pulp tissue features compared to the observed in untouched teeth ($P<0.01$).

Conclusion: The results presented herein have uncovered protective roles for RvE1 in pulp inflammation, suggesting that it may be a candidate for a novel therapeutic strategy for preservation of its vitality.

Keywords: Endodontics, dental pulp, inflammation, resolvin, conservative treatment of dental pulp

Introduction

The main objective of the conservative treatment of the dental pulp is to avoid its irreversible damage and necrosis. In this regard, a number of different materials have properties that, under aseptic conditions, can induce a favorable response by the pulp (1-6). On the other hand, when microorganisms and their byproducts are a permanent part of aggression, flogistic responses are induced that impair resolution of inflammation, dramatically decreasing the success rates of direct pulp capping (7).

Due to its anti-inflammatory properties, topical corticosteroids have been advocated to reduce post-operative pain and to assist pulp tissue healing (8-9). On the other hand, when used for long periods and in the presence of microorganisms, this approach seems to have less than ideal effects on the pulp, leading to delayed wound healing, thus inhibiting collagen synthesis and resulting in incomplete and irregular hard tissue barrier formation (9-11).

Differently from the corticosteroids, a novel class of lipid-derived endogenous molecules, in which RvE1 is included, have been considered promising for the development of resolution-based pharmacology and lipidomics-based therapeutics (12-14). Among lipid-derived compounds, RvE1 has shown to improve treatment outcomes in a wide range of inflammatory diseases (15-18). RvE1 does not impair the endogenous healing pathways, acting locally to stop leukocyte recruitment and promote resolution of the inflammatory response. Moreover, this lipid mediator presents potent immunomodulating properties, which regulate the resolution phase of the active immune response (13-15).

Considering the need for improving healing outcomes in putatively infected dental pulps and the beneficial effects of RvE1 observed in several medical situations (16-19) and periodontal disease (20), the aim of this study was to evaluate the effect of the topical application of RvE1 in the inflammatory response of dental pulps exposed to the oral environment.

Methods

The study protocols were approved by Institutional Animal Care and Use Committees of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS) under Protocol #09/00131.

The sample consisted of the right mandibular first molars of 42 male *Wistar* rats weight 230-270 g (3 months old). Six animals were used to observe the characteristics of untouched dental pulps (negative control). The remaining 36 animals were used for testing the effect of topical application of 0.1% ethanol (vehicle of RvE1 - positive control), RvE1 (1 µg/ml in 0.1% ethanol) and a corticosteroid/antibiotic association (Otosporin®, Wellcome, São Paulo, SP, Brazil), on infected dental pulps.

Surgical Procedures

To perform the experimental procedures, the animals were anesthetized intraperitoneally with ketamine 80 mg/Kg body weight and xylazine 20 mg/Kg body weight (Virbac do Brasil, Juruatuba, SP, Brazil). Mouth opening was achieved by using a previously designed device (21), and the soft tissues were kept away with the aid of dental forceps.

In order to induce pulp inflammation and its infection, dental pulps were exposed by drilling cavities on the central portion of the occlusal surface, with a 1011 HL round bur (KG Sorensen, Cotia, SP, Brazil) in high speed under copious water cooling to a depth nearly equal to the bur diameter (1 mm), and the teeth were left open to the oral environment for 24 hours. After this period, debris were removed from the cavities using Rhein probes and the teeth were irrigated with 0.9% sterile saline solution. The cavities were dried with sterile cotton pellets and 0.1% ethanol (vehicle of RvE1), RvE1 or a corticosteroid/antibiotic association was applied directly on the pulp tissue with sterile cotton pellets. The teeth were sealed with silver amalgam. The animals were divided into two experimental periods (n= 6 per group), in which the medications remained for 24 and 72 hours. At these periods, euthanasia was performed by inhalation of overdose of isoflurane (BioChimico, Itatiaia, SP, Brazil), and the jaws were dissected and processed for histological evaluation.

Sample preparation and histological analysis

Samples were fixed with buffered 10% paraformaldehyde for 24 hours, decalcified in 17% EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) for 5 weeks, dehydrated in ascending concentrations of ethanol, and embedded in paraffin. Five-micrometer serial sections in the vestibular-lingual direction were stained with hematoxylin-eosin. Three sections were selected for each sample, so the central portion of the teeth was visible.

A histological analysis was performed, emphasizing the characteristics of the dental pulp tissue. After a training session explaining the gold standard of the evaluation parameters, two blinded, calibrated examiners ($Kappa > 0.7$;

P<0.001) analysed and graded the intensity of pulp inflammation and extension of pulp damage (Tables 1 and 2).

Statistical Analysis

Sample size estimation was obtained using SPSS® 16 for Mac (SPSS, Chicago, IL, USA). Statistical analysis was performed by using statistical software (Prism version 4.00 for Windows; GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Histological data were evaluated using two-way ANOVA (analysis of variance) and Bonferroni post-hoc. Differences were regarded significant when P<0.05.

Results

During the experimental procedures and histological preparation five samples were lost. Due to this reason, 37 specimens were evaluated only.

None of the tested drugs promoted pulp tissue characteristics that totally resembled those of the reference untouched teeth (Figure 1, A and B). On the other hand, the scores used for histological evaluation showed that RvE1 treated teeth presented reduction of both intensity and extension of pulp tissue alterations compared to the other groups (Figure 1, A).

At the 24 hours post-operative period, the 0.1% ethanol-medicated teeth presented intense inflammatory infiltrate, mainly consisting of neutrophils, and hyalinization areas in response to the procedures. Fiber condensation was observed, and the changes were restricted to the cervical third of the root canals (Figure 1, C). Nevertheless, after 72 hours, a broader pattern of hyalinization areas could be observed through cervical and middle thirds of root canals. Degenerative alterations were predominant compared to cellular

inflammatory response. Inflammatory cells, when present, mainly consisted of monocytes (Figure 1, D). In some samples, abundant blood vessels and hemosiderin pigmentation were also observed.

After the 24 hours of treatment with RvE1 a mild inflammatory infiltrate, mainly comprised of neutrophils, was observed. In some samples few monocytes and macrophages could also be observed. The inflammation was restricted to the coronal portion of the teeth and the entrance of root canals, being limited by fiber condensation and surrounded by healthy pulp tissue with abundant cells and vessels (Figure 2, A). After 72 hours, the response was characterized by a striking decrease in the overall distribution of inflammatory cells, which mainly consisted of monocytes and macrophages. In some samples, hyalinization areas could be also observed. These alterations, when present, were contained, being restricted to the cervical third of the root canals (Figure 2, B).

In contrast, teeth treated with corticosteroid showed a variable inflammatory response during the two experimental periods. Although some specimens presented reduced inflammatory response, most of them showed intense inflammatory infiltrate abundantly comprised of neutrophils and extensive hyalinization areas, which were not limited by fibrous condensation, and reached the cervical and middle third of the root canals. In both evaluated periods, degenerative alterations were predominant compared to cellular inflammatory response. Abundant vessels and external root resorption could be observed in some specimens (Figure 3, A and B).

Discussion

The current results showed, for the first time, the beneficial effects of direct application of RvE1 on dental pulp tissue. Besides, differently from other studies (8-9), the effect of the tested medications were evaluated in infected dental pulps, which has been considered a limitation to the success of direct pulp capping (6-7,22).

RvE1 promoted contained and milder pulp alterations compared to 0.1% ethanol and corticosteroid. Similarly, other studies showed that RvE1 has potential for favoring healing and leading to tissue homeostasis in situations of microorganisms-mediated inflammation (19-20,23-24). Homeostasis is the maintenance of the internal environment within tolerable limits and is often described as a process of equilibrium where basal biological processes take part. Since RvE1 has no inherent known antibacterial activity (20), its action on pathogen aggression is likely related to the stimulation of physiologic pro-resolution responses. As previously stated, RvE1 acts at the cellular and tissue level generating specific mediators that can dampen the magnitude of the leukocyte infiltrate during inflammation and promote resolution (25-26). Accordingly, it has already been demonstrated that RvE1 specifically interacts with neutrophils and monocytes receptors to regulate leukocytes during inflammation (15), and also stimulates the uptake and clearance of local cytokines (27) and the amendment phagocytosis by the macrophages.

Differently, corticosteroids act on the host defense inhibiting pathways that are implicated in tissue healing. The blockage of aradonic acid impair the production mediators of the inflammatory process, i.e cyclooxygenase 2 (COX-2), which take part of the mechanisms of inflammation-based damage, but are

essential for wound healing and resolution processes. As a matter of fact, the production of pro-resolution mediators are derived from the arachidonic acids and stimulated by the COX-2 in the later stages of inflammation (12, 25-26).

Differently from some previous reports (8-9), our results showed no beneficial effects of the direct application of corticosteroid on pulp tissue, which also led to external root resorption in some samples. These findings could be related to the milieu created, which included a persistent stimuli triggered by pathogens and to the longer periods in which the pulp tissue was exposed to the tested treatments. Although the use of corticosteroids seems to control pulp tissue inflammatory reactions on a short term basis, its action for longer periods likely results in the retardation of tissue repair (8-9,11). Besides, unlike RvE1, corticosteroids act blocking host defense instead of modulating it, which certainly contributes in the perpetuation of pathogen-triggered damage, resulting in more extensive and intense alterations.

Pro-resolution lipid mediators act by inducing a lipid profile switch, activating a non-inflammatory pathway and changing cell phenotypes rather than just blocking a physiological process (28). In the present study, teeth treated with RvE1 showed mainly a cellular response, with little if any alterations that resembled degeneration, especially after 72 hours. Also noteworthy, at 72 hours two key features of the pulp response to RvE1 were observed; first, a mild monocytic infiltrate was the predominant feature within the tissue and, second, these cells and the process as a whole were particularly contained within the pulp are adjacent to the exposition. The non-flogistic recruitment of monocytes has been characterized as a key feature of the late phases of inflammation as a response to RvE1, and is explained by the

biological need for clearance of infiltrated, no-longer in demand, now apoptotic, neutrophils (26). In contrast, teeth treated with 0.1% ethanol or corticosteroid, promoted degenerative alterations and partial pulp necrosis, which revealed the irreversible damage induced on the pulp. In this regard, the results show that RVE1 has a striking potential to be explored for the treatment of exposed and infected dental pulps due to its pro-resolution and protective properties.

The results presented herein have uncovered protective roles for RvE1 in pathogen-mediated inflammation that are both anti-inflammatory and protective for host defense, suggesting that RvE1 represents an important candidate for novel therapeutic strategies that aim at improving success of conservative treatment of infected dental pulps.

References

1. 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 Radiol Endod* 2008;106:609-14.
2. Accorinte ML, Loguercio AD, Reis A, et al. Evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide cement as pulp capping agents in human teeth. *J Endod* 2008;34:1-6.
3. 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;41:128-50.

4. Nakamura Y, Hammarstrom L, Matsumoto K, Lyngstadaas SP. The induction of reparative dentine by enamel proteins. *Int Endod J* 2002; 35:407-17.
5. Igarashi R, Sahara T, Shumizu-Ishiura M, Sasaki T. Porcine enamel matrix derivative enhances the formation of reparative dentin and dentin bridges during wound healing of amputated rat molars. *J Electron Microsc* (Tokyo) 2003;52:227-36
6. Bogen G, Kim JS, Bakland LK. Direct pulp capping with mineral trioxide aggregate: an observational study. *J Am Dent Assoc* 2008;139:305-15.
7. 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;29:525-8.
8. Fachin EV, Scarparo RK, Pezzi AP, Luisi SB, Sant'ana Filho M. Effect of betamethasone on the pulp after topical application on the dentin of rat teeth: vascular aspects of inflammation. *J Appl Oral Sci* 2009;17:335-9.
9. Oliveira MF, Giro EMA, Ramalho LTO, Abbud R. Tissue response to direct pulp capping with calcium hydroxide preceded by corticosteroid or corticosteroid/antibiotic dressing: a histological study in rats. *J Dent Sci* 2009;24:337-82.
10. Rapoport L, Abramson LL. Application of steroid hormones in pulp-capping and pulpotomy procedures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1958;11:545-8.
11. Souza V, Holland R. Treatment of the inflamed dental pulp. *Aust Dent J* 1974;19:191-6.

12. Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nature Immunol* 2001;2:612–9.
13. Serhan CN. A search for endogenous mechanisms of anti-inflammation uncovers novel chemical mediators: missing links to resolution. *Histochem Cell Biol* 2004;122:305-21.
14. Serhan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Chiang N, Gronert K. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med* 2000;192:1197–204.
15. Arita M, Ohira T, Sun YP, Elangovan S, Chiang N, Serhan CN. Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. *J Immunol* 2007;178: 3912–7.
16. Aoki H, Hisada T, Ishizuka T, et al. Protective effect of resolvin E1 on the development of asthmatic airway inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;400:128-33.
17. Keyes KT, Ye Y, Lin Y, et al. Resolvin E1 protects the rat heart against reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;299:H153-64.
18. Li N, He J, Schwartz CE, Gjorstrup P, Bazan HE. Resolvin E1 improves tear production and decreases inflammation in a dry eye mouse model. *J Ocul Pharmacol Ther* 2010;26:431-9.
19. Rajasagi NK, Reddy PB, Suryawanshi A, Mulik S, Gjorstrup P, Rouse

- BT. Controlling herpes simplex virus-induced ocular inflammatory lesions with the lipid-derived mediator resolvin E1. *J Immunol* 2011;186:1735-46.
20. Hasturk H, Kantarci A, Ohira T, et al. RvE1 protects from local inflammation and osteoclast-mediated bone destruction in periodontitis. *FASEB J* 2006;20:401-3.
21. Scarparo RK, Dondoni L, Böttcher DE, Grecca FS, Rockenbach MIB, Batista EL Jr. Response to intracanal medication in immature teeth with pulp necrosis: an experimental model in rat molars. *J Endod* 2011;37:1069-73.
22. Trope M. Regenerative potential of dental pulp. *Pediatr Dent* 2008;30:206-10.
23. Poulsen RC, Gotlinger KH, Serhan CN, Kruger MC. Identification of inflammatory and proresolving lipid mediators in bone marrow and their lipidomic profiles with ovariectomy and omega-3 intake. *Am J Hematol* 2008;83:437-45.
24. Van Dyke TE. The management of inflammation in periodontal disease. *J Periodontol* 2008;79:1601-8.
25. Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 2005;6:1191-7.
26. Gilroy DW, Lawrence T, Perretti M, Rossi AG. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:401-16.

27. Ariel A, Fredman G, Sun YP, et al. Apoptotic neutrophils and T cells sequester chemokines during immune response resolution through modulation of CCR5 expression. *Nature Immunol* 2006;7:1209–16.
28. Van Dyke TE. Proresolving lipid mediators: potential for prevention and treatment of periodontitis. *J Clin Periodontol* 2011;38 Suppl 11:119-25.

Table 1. Scores used to evaluate the intensity of pulp inflammation

<i>Score</i>	<i>Criteria for classifying the characteristics of pulp tissue</i>
1	Absence of inflammation and hyalinization areas
2	Slight inflammatory infiltrate restricted by fiber condensation; underlying tissue showing absence of inflammatory cells and hyalinization areas
3	Moderate inflammatory infiltrate or small hyalinization areas/tissue necrosis restricted by fiber condensation; underlying tissue showing small hyalinization areas
4	Moderate inflammatory infiltrate or extensive hyalinization areas/tissue necrosis not restricted by fiber condensation; underlying tissue showing sparse inflammatory cells
5	Severe inflammatory infiltrate or extensive hyalinization areas/tissue necrosis dominating the pulp tissue

Table 2. Scores used to evaluate the extension of pulp damage

<i>Score</i>	<i>Criteria for classifying the extension of pulp alterations</i>
1	Absence of inflammation and hyalinization areas
2	Inflammatory/degenerative responses restricted to the area of pulp exposure
3	Inflammatory/degenerative responses restricted to the entrance of root canals
4	Inflammatory/degenerative responses restricted to the cervical third of the root canals
5	Inflammatory/degenerative responses not restricted to the cervical third of the root canals, reaching the middle third

Figure Legends

Figure 1. (A) Histological analysis of pulp tissue at 24 and 72 hours post treatment. At 24 hours, treatment with RvE1 presented a less intense inflammatory response compared to the corticosteroid ($\star\star P < 0.01$). Untouched teeth were significant different from the RvE1 medicated teeth ($\bullet\bullet P < 0.01$) and from the other test groups ($\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle P < 0.001$). After 72 hours RvE1 promoted significant milder inflammation compared to 0.1% ethanol ($\star\star\star P < 0.001$) and to corticosteroid ($\star\star P < 0.01$). Negative control were significant different from the other three groups ($\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle P < 0.001$). Related to the extension of pulp damage, at both post operative periods, 24 and 72 hours, RvE1 produced a containment of inflammation compared to 0.1% ethanol and to corticosteroid ($\star P < 0.05$; $\star\star P < 0.01$, respectively). None of the drugs promoted tissue characteristics that totally resembled untouched teeth ($\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$; $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle P < 0.001$). **(B)** Histological aspects of untouched teeth. Absence of inflammatory and degenerative alterations in the entire extension of pulp tissue; hematoxylin-eosin stain, original magnification 50x. **(C)** At 24 hours, 0.1% ethanol-treated teeth showed intense neutrophilic infiltrate (\star) and pulp damage restricted to the cervical third of root canals (arrows); hematoxylin-eosin stain, original magnification 50x and detail of figure (\square) 100x. **(D)** At 72 hours, pulp tissue subjected to 0.1% ethanol medication showed extensive damage (arrows), intense inflammatory infiltrate (\star) and degenerative alterations (\blacktriangle); hematoxylin-eosin stain, original magnification 50x and detail of figure (\square) 100x.

Figure 2. Histological aspects pulp tissue after topic application of RvE1. At 24 hours **(A)** a mild and contained cellular inflammatory response was observed (\star). Pulp damage was limited to the areas of pulp exposure or to the entrance of root canals (arrows); hematoxylin-eosin stain, original magnification 50x and detail of figure (\square) 100x. At 72 hours **(B)** a mild monocytic cell infiltrate (\star) was detected reaching the cervical third of the root canals (arrows), although limited by fibrous condensation (\star) and surrounded by healthy tissue; hematoxylin-eosin stain, original magnification 50x and detail of figure (\square) 100x.

Figure 3. Histological aspects of topical corticosteroid treatment at 24 hours **(A)** and 72 hours **(B)** in infected dental pulps. Response mainly consisted of degenerative alterations and partial necrosis (**★**). In both periods the pulp tissue damage was not restricted by fibrous condensation and reached the middle third of the root canals (arrows). In some samples external root resorption was detected (**★**); hematoxylin-eosin stain, original magnification 50x and detail of figure (□) 100x.

Figure 1

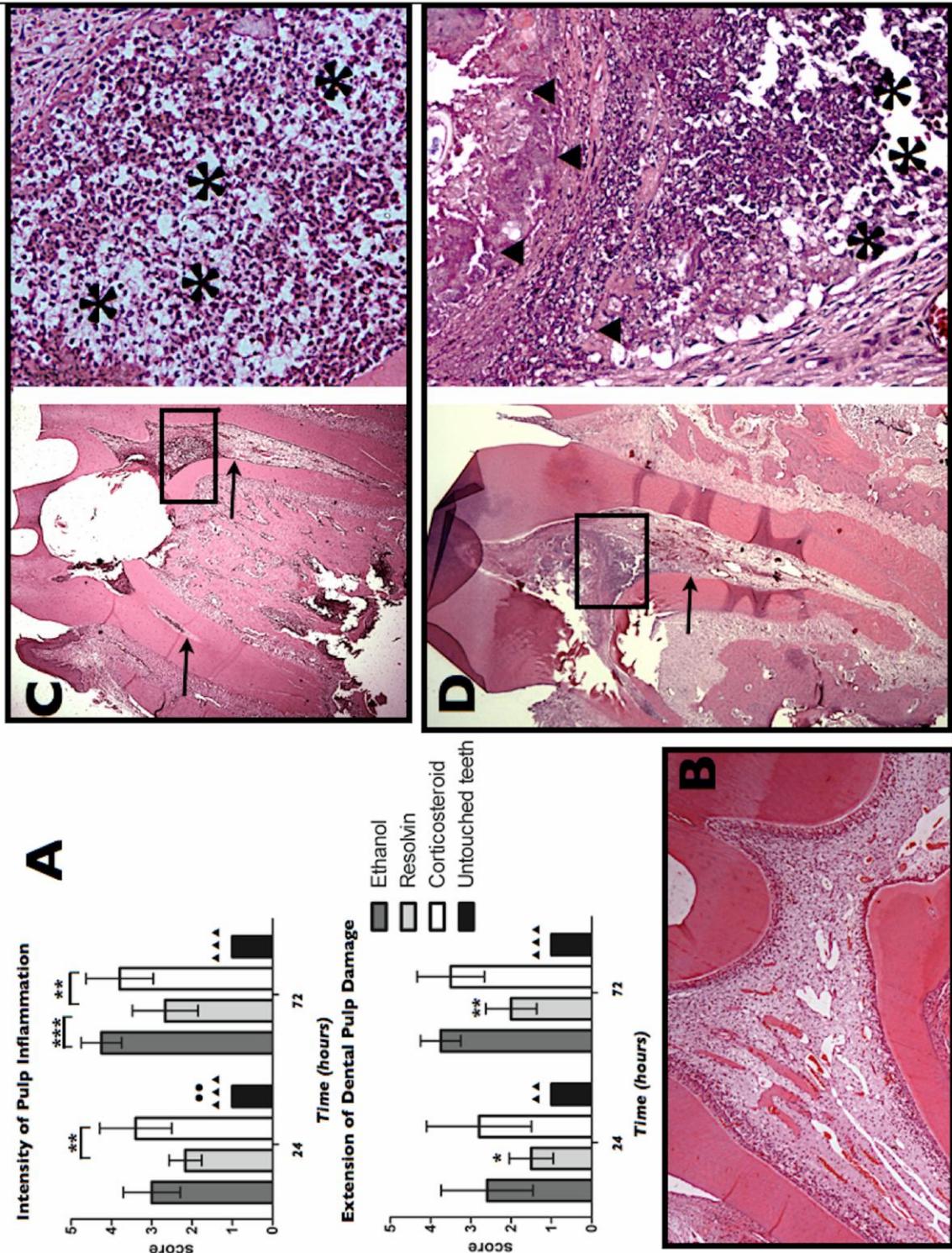


Figure 2

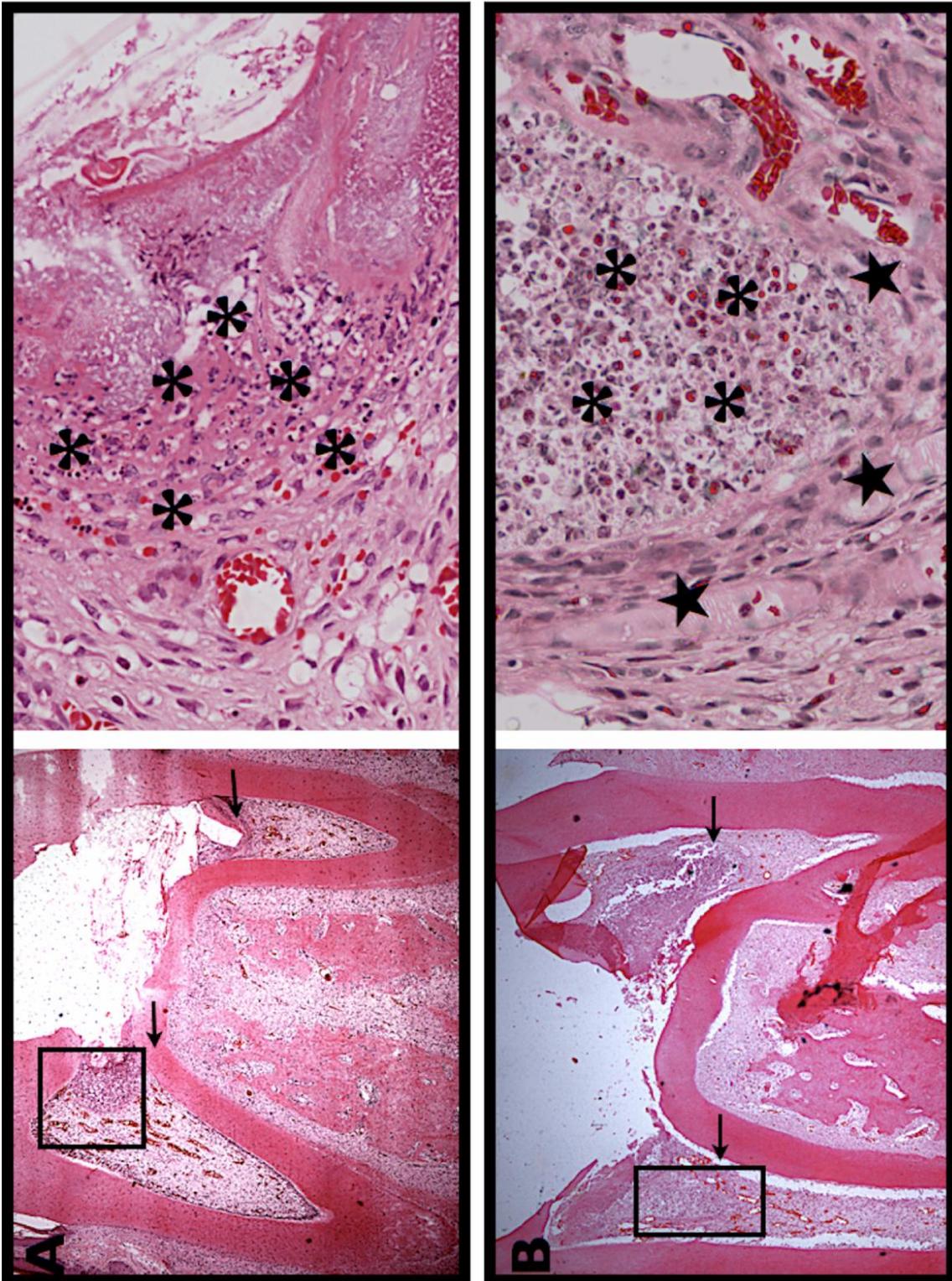
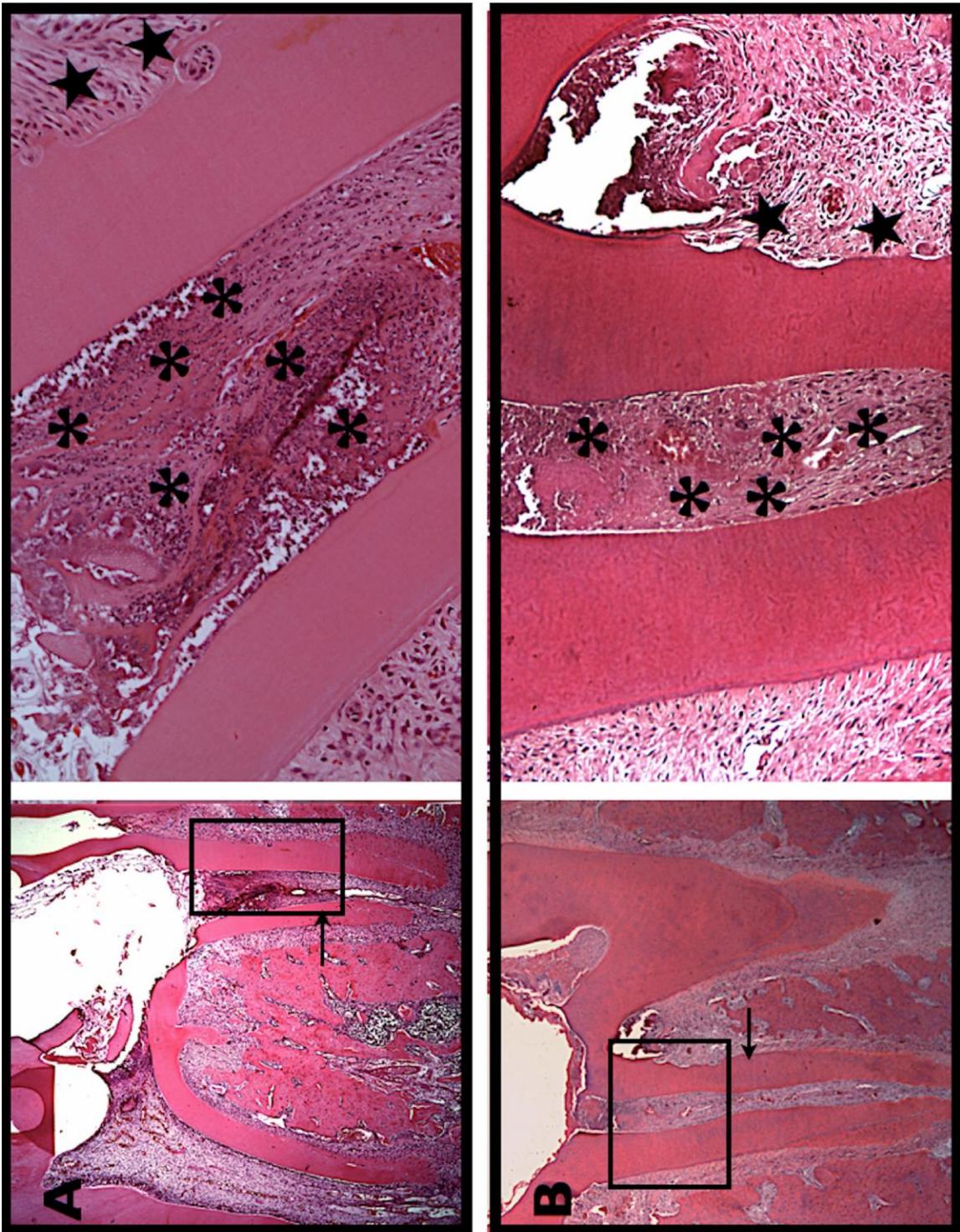


Figure 3



3. DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho mostraram, pela primeira vez, os efeitos benéficos da aplicação tópica da RvE1 sobre o tecido pulpar. Além disso, diferentemente de outros estudos (16-17), o efeito dos medicamentos testados foi avaliado em polpas dentais infectadas, o que tem sido considerado uma limitação para o sucesso do capeamento pulpar direto (8-9,11).

A RvE1 promoveu alterações pulpares mais contidas e mais leves, comparadas ao etanol 0.1% e ao corticosteróide. Da mesma forma, outros estudos mostraram que a RvE1 tem potencial para favorecer a cicatrização, levando o tecido à homeostase em situações de inflamação mediada por microrganismos (21,28-30). A homeostase é a manutenção do ambiente interno dentro de limites toleráveis e é muitas vezes descrita como um processo de equilíbrio. Uma vez que a RvE1 não tem atividade antibacteriana inerente (29), sua ação sobre patógenos agressores está provavelmente relacionada ao estímulo de respostas fisiológicas. Como já afirmado anteriormente, a RvE1 atua no nível celular e tecidual gerando mediadores específicos que podem atenuar a magnitude do infiltrado leucocitário durante a inflamação e promover a resolução (31-32). Assim, já foi demonstrado que a RvE1 interage especificamente com receptores de neutrófilos e monócitos regulando os leucócitos durante a inflamação (33), e também estimula a captação e remoção de citocinas locais e a fagocitose pelos macrófagos (34).

Com mecanismo de ação diferente dos mediadores lipídicos, os corticosteróides têm influência sobre as vias de defesa do hospedeiro inibindo rotas que implicam na cicatrização do tecido. O bloqueio do ácido araquidônico prejudica a produção de mediadores do processo inflamatório, ou seja, da

ciclooxigenase 2 (COX-2), que apesar de fazer parte dos mecanismos da inflamação, é essencial para os processos de cicatrização e resolução. Por uma questão de fato, a produção de mediadores pró-resolução como as lipoxinas é derivada do ácido araquidônico e estimulada pela COX-2 nos estágios mais avançados da inflamação (31-32,35).

Diferentemente de outros estudos (16-17), os resultados apresentados não mostraram efeitos benéficos na aplicação tópica do corticosteróide no tecido pulpar e reabsorção radicular externa pode ser observada em algumas amostras. Estas observações podem estar relacionadas à infecção induzida e aos longos períodos em que o tecido pulpar ficou exposto à medicação. Embora os corticosteróides sejam utilizados por curtos períodos para o controle da reação inflamatória do tecido pulpar, a sua ação por longos períodos pode resultar no retardo do reparo tecidual (16-18). Além disso, ao contrário da RvE1, os corticosteróides agem bloqueando a defesa do hospedeiro, em vez de modulá-la, o que certamente contribui para a continuidade dos danos acionados pelos microrganismos, resultando em alterações mais extensas e intensas.

Neste estudo o corticosteróide foi utilizado em associação com antibiótico, comercialmente disponível com o nome de Otosporin® e composta por hidrocortisona (10 mg/ml), sulfato de polimixina B (10.000 U.I./ml) e sulfato de neomicina (5 mg/ml). Esse tipo de associação é bastante utilizada e suporta-se no fato de que a eficácia é maior que a do corticosteróide sozinho, já que o antibiótico atua sobre possíveis bactérias presentes no tecido inflamado (17).

Nos resultados do presente trabalho, os dentes tratados com RvE1 mostraram principalmente uma resposta celular, com nenhuma ou pouca alteração degenerativa, especialmente no segundo período experimental (72 horas). Em contraste, os dentes medicados com etanol 0.1% ou com o corticosteróide, promoveram principalmente alterações degenerativas e necrose pulpar parcial, o que revela o dano irreversível induzido ao tecido pulpar. A esse respeito, os resultados mostram que a RvE1 tem um potencial a ser explorado para o tratamento de polpas dentais expostas e infectadas devido as suas propriedades pró-resolução e de proteção. Por outro lado, a observação de resolução completa não foi detectada. Este achado sugere que mais estudos devem ser realizados com foco na obtenção de concentrações ideais e sistemas de distribuição para o uso tópico de RvE1 na Endodontia.

O modelo utilizado de dente molar de rato é válido para teste pré-liminar da biocompatibilidade de materiais utilizados na Odontologia, sendo as pesquisas realizadas em polpas de molares de ratos transferíveis a humanos e a outras espécies animais. Além disso, é um modelo de baixo custo e que pode reduzir ao mínimo o uso de outros animais de maior porte (36-37).

Os resultados apresentados revelaram as funções de proteção da RvE1 na inflamação mediada por patógenos que são antiinflamatórias e de proteção para a defesa do hospedeiro, sugerindo que a RvE1 representa uma importante candidata no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para melhorar os índices de sucesso do tratamento conservador da polpa dental infectada.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os resultados apresentados, neste trabalho, sugerem funções protetoras da RvE1 na inflamação pulpar mediada por patógenos. Assim, a RvE1 representa uma candidata importante para novas estratégias terapêuticas que visem melhorar o sucesso do tratamento conservador de polpas dentais infectadas.

- Investigações futuras deverão concentrar-se na compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos no processo do controle do dano pulpar em resposta à RvE1, no seu potencial como composto indutor de dentina reparadora e na obtenção de concentrações ideais e sistemas de distribuição para o seu tópico na Endodontia.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13(2):171-83.
2. 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(3):340-9.
3. Goldberg M, Farges JC, Lacerda-Pinheiro S, et al. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacol Res* 2008;58(2):137-47.
4. Hahn CL, Liewehr FR. Innate immune responses of the dental pulp to caries. *J Endod* 2007;33(6):643-51.
5. Pisterna GV, Siragusa M. CD44 Presence in inflamed pulp tissue. *J Endod* 2007;33(10):1203-7.
6. 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.
7. Tziafas D. The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration. *Caries Res* 2004;38(3):314-20.
8. 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.
9. Trope M. Regenerative potential of dental pulp. *Pediatr Dent* 2008;30(3):206-10.

10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Accorinte ML, Loguercio AD, Reis A, et al. Evaluation of two mineral trioxide aggregate compounds as pulp-capping agents in human teeth. *Int Endod J* 2009;42(2):122-8.
15. 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.
16. Fachin EV, Scarparo RK, Pezzi AP, Luisi SB, Sant'ana Filho M. Effect of betamethasone on the pulp after topical application on the dentin of rat teeth: vascular aspects of inflammation. *J Appl Oral Sci* 2009;17(4):335-9.
17. Oliveira MF, Giro EMA, Ramalho LTO, Abbud R. Tissue response to

- direct pulp capping with calcium hydroxide preceded by corticosteroid or corticosteroid/antibiotic dressing: a histological study in rats. *J Dent Sci* 2009;24(4):337-82.
18. Souza V, Holland R, Souza RS. Behaviour of the dental pulp after cavity preparation and topical application of corticosteroid-antibiotic associations on the floor of the cavity. *Rev Odontol UNESP* 1996;25(2):181-92.
 19. Manchikanti L. Role of neuraxial steroids in interventional pain management. *Pain Physician* 2002;5:182-99.
 20. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* 2008;8(5):349-61.
 21. Poulsen RC, Gotlinger KH, Serhan CN, Kruger MC. Identification of inflammatory and proresolving lipid mediators in bone marrow and their lipidomic profiles with ovariectomy and omega-3 intake. *Am J Hematol* 2008;83(6):437-45.
 22. Serhan CN. Systems approach with inflammatory exudates uncovers novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2008;79(3-5):157-63.
 23. Serhan CN, Yacoubian S, Yang R. Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. *Annu Rev Pathol* 2008;3:279-312.
 24. Serhan CN, Chiang N. Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. *Br J Pharmacol* 2008;153 Suppl 1:S200-15.

25. Aoki H, Hisada T, Ishizuka T, et al. Protective effect of resolvin E1 on the development of asthmatic airway inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;400:128-33.
26. Keyes KT, Ye Y, Lin Y, et al. Resolvin E1 protects the rat heart against reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;299:H153-64.
27. Li N, He J, Schwartz CE, Gjorstrup P, Bazan HE. Resolvin E1 improves tear production and decreases inflammation in a dry eye mouse model. *J Ocul Pharmacol Ther* 2010;26:431-9.
28. Rajasagi NK, Reddy PB, Suryawanshi A, Mulik S, Gjorstrup P, Rouse BT. Controlling herpes simplex virus-induced ocular inflammatory lesions with the lipid-derived mediator resolvin E1. *J Immunol* 2011;186:1735-46.
29. Hasturk H, Kantarci A, Ohira T, et al. RvE1 protects from local inflammation and osteoclast-mediated bone destruction in periodontitis. *FASEB J* 2006;20:401-3.
30. Van Dyke TE. The management of inflammation in periodontal disease. *J Periodontol* 2008;79(8):1601-8.
31. Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 2005;6:1191-7.
32. Gilroy DW, Lawrence T, Perretti M, Rossi AG. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:401-16.
33. Arita M, Ohira T, Sun YP, Elangovan S, Chiang N, Serhan CN.

- Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. *J Immunol* 2007;178: 3912–7.
34. Ariel A, Fredman G, Sun YP, et al. Apoptotic neutrophils and T cells sequester chemokines during immune response resolution through modulation of CCR5 expression. *Nature Immunol* 2006;7:1209–16.
 35. Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nature Immunol* 2001;2:612–9.
 36. Dammaschke T. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. *Laboratory Animals* 2010;44:1-6.
 37. Costa CAS, Oliveira MF, Giro EMA, Hebling J. Biocompatibility of resin-based materials used as pulp-capping agents. *International Endodontic Journal* 2003;36:831-9.
 38. Nakamura Y, Hammarstrom L, Matsumoto K, Lyngstadaas SP. The induction of reparative dentine by enamel proteins. *Int Endod J* 2002; 35:407-17.
 39. Rapoport L, Abramson LL. Application of steroid hormones in pulp-capping and pulpotomy procedures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1958;11:545-8.
 40. Souza V, Holland R. Treatment of the inflamed dental pulp. *Aust Dent J* 1974;19:191-6.
 41. Serhan CN. A search for endogenous mechanisms of anti-inflammation uncovers novel chemical mediators: missing links to resolution. *Histochem. Cell Biol* 2004;122:305-21.

42. Serhan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Chiang N, Gronert K. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med* 2000;192:1197–204.
43. Scarparo RK, Dondoni L, Böttcher DE, Grecca FS, Rockenbach MIB, Batista EL Jr. Response to intracanal medication in immature teeth with pulp necrosis: an experimental model in rat molars. *J Endod* 2011;37:1069-73.
44. Van Dyke TE. Proresolving lipid mediators: potential for prevention and treatment of periodontitis. *J Clin Periodontol* 2011;38 Suppl 11:119-25.

6. ANEXO



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

Ofício 127/09 – CEUA

Porto Alegre, 17 de dezembro de 2009.

Senhor Pesquisador:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 09/00131, intitulado: **“Efeito da resolvina E1 - mediador lipídico antiinflamatório e pró-resolução na inflamação pulpar e na indução de dentinogênese reparadora”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,



Prof. Dra. Anamaria Gonçalves Feijó
Coordenadora do CEUA – PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Eraldo Luiz Batista Jr.
N/Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314
CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br