

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**UTILIZAÇÃO DE OTÓLITOS DE *Cynoscion acoupa* APÓS
EXPOSIÇÃO PULPAR EM DENTES DE CÃES:
UM ESTUDO EXPERIMENTAL COMPARATIVO**

DAISY PEREIRA VALIDO

ARACAJU – 2010

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**UTILIZAÇÃO DE OTÓLITOS DE *Cynoscion acoupa* APÓS
EXPOSIÇÃO PULPAR EM DENTES DE CÃES:
UM ESTUDO EXPERIMENTAL COMPARATIVO**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente, na área de concentração Saúde e Ambiente.

DAISY PEREIRA VALIDO

Orientadores: Prof. Ricardo Luiz C. de Albuquerque Júnior, D. Sc.
Prof. Lauro Xavier Filho, D. Sc.

ARACAJU – 2010

V172u Valido, Daisy Pereira.

Utilização de otólitos de *Cynoscion acoupa* após exposição pulpar em dentes de cães: um estudo experimental comparativo. / Daisy Pereira Valido; orientação [de] Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, Lauro Xavier Filho. – Aracaju, 2010.

99 f. : il.

Inclui bibliografias

Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Tiradentes (UNIT).

1. Otólitos. 2. Capeamento da polpa dentaria. 3. Materiais biocompatíveis. 4. Hidróxido de cálcio. 5. Cavidade pulpar dental. I. Albuquerque Júnior, Ricardo Luiz Cavalcanti de (orient.). II. Xavier Filho, Lauro (orient). III. Universidade Tiradentes (UNIT). IV. Título.

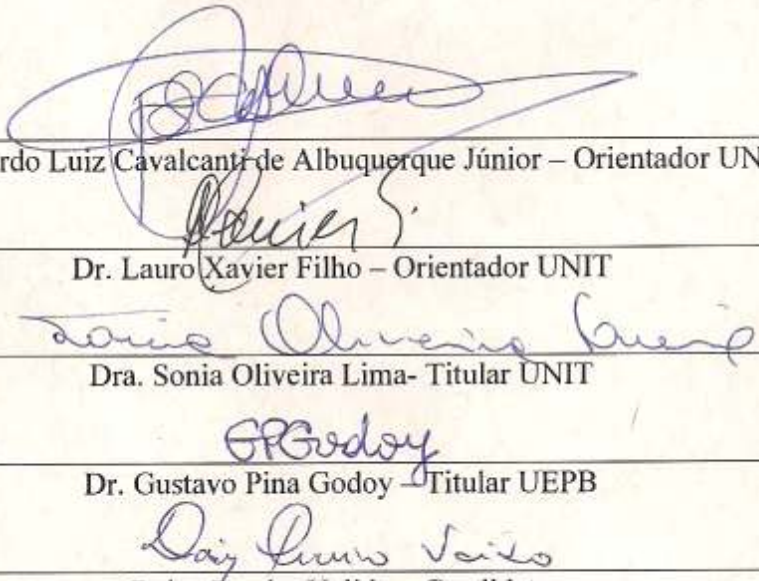
CDU: 616.314:619

**UTILIZAÇÃO DE OTÓLITOS DE *Cynoscion acoupa* APÓS EXPOSIÇÃO
PULPAR EM DENTES DE CÃES: UM ESTUDO EXPERIMENTAL
COMPARATIVO**

Daisy Pereira Valido

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
SAÚDE E AMBIENTE DA UNIVERSIDADE TIRADENTES, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE
EM SAÚDE E AMBIENTE.

Aprovada por:



Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior – Orientador UNIT

Dr. Lauro Xavier Filho – Orientador UNIT

Dra. Sonia Oliveira Lima- Titular UNIT

Dr. Gustavo Pina Godoy – Titular UEPB

Daisy Pereira Valido – Candidato

Aracaju
Abril - 2010

Dedico esse trabalho:

A Isadora, minha filha,
por tudo o que ela representa em minha vida.

Meu Deus,
Fazei-me um ser diferente
Mais harmonioso
Menos intransigente

Senhor,
Fazei-me um ser diferente
Menos ansioso
Mais paciente

Meu Deus,
Fazei-me um ser diferente
Mais parcimonioso
Menos incoerente

Senhor,
Fazei-me simplesmente
SER

Meu Deus,
Fazei-me um ser diferente
Fazei-me
GENTE

“Alguns homens vêem as coisas como elas são
e dizem por quê?
Eu sonho com coisas que nunca foram feitas,
E digo por que não?”

George Bernard Shaw

Agradecimentos:

A Deus, que, ao dispor os desafios da vida, permite que nos reinventemos na busca de superá-los.

A Roberto, pelo amor, equilíbrio, serenidade, harmonia, hombridade, companheirismo e amizade dedicados a mim, cotidianamente, em todos estes anos de convivência. Obrigada por me proporcionar muito mais do que eu preciso para ser feliz.

A Isadora, minha filha, fonte de inspiração pessoal e profissional, expectativa máxima de amor em minha vida. “Seus olhos, meu clarão, me guiam dentro da escuridão, seus pés me abrem os caminhos, eu sigo e nunca me sinto só... você é assim, um sonho pra mim...”

A Valdir, minha mãe, por ter encaminhado suas filhas, apesar de tantas adversidades, nos apontando sempre o caminho da coragem, da independência e da liberdade. Obrigada pela sapiência e desvelo incondicional.

À minha saudosa e cativante avó Carminha, *in memoriam*, por ter tido um caráter que, de tão forte e positivo, ainda se mantém vivo como um exemplo para os seus.

Às minhas amadas irmãs: Sonia, Denise, Viviane e Vanessa pelos momentos alegres e descontraídos junto ao restante da trupe: Pedro e Renata; Hylton, Heraldito, Heraldinho, Hugo e ao “delicinha” do Arthur; Bruno e Bruninho. Vocês fazem parte do meu destino.

À Prof^a. Dr^a. Sonia Oliveira Lima, exemplo de dedicação profissional, a quem a vida não só nos uniu por laços consanguíneos, mas por uma incomensurável amizade.

Ao médico patologista, Dr. Antônio Roberto de Oliveira Ramalho, para sempre o meu querido Robertinho, pela paciência e cuidado no processamento de todas as lâminas.

A Hylton Déda, pela amizade.

A Rubens Lisboa, meu anjo da guarda, a quem não encontro palavras para agradecer pela cumplicidade.

Ao Desembargador Cláudio Dinart Déda Chagas pela confiança em mim depositada.

Ao Laboratório de Anatomia Patológica Dr^a Mônica Araújo, pelos recursos técnicos no processamento das lâminas.

Aos Professores José Sebastião dos Santos e José Júlio Seabra Santos pela viabilização do meu trabalho quando autorizaram a realização da minha pesquisa na Faculdade Pio Décimo e liberaram, em todas as fases do experimento, as instalações e o corpo clínico do Hospital Veterinário Dr. Vicente Borelli.

A Faculdade Pio Décimo pela realização deste experimento.

Ao Prof. Eduardo Luiz Cavalcante Caldas, diretor do Hospital Veterinário, pelo acolhimento com que fui recepcionada.

Pelo apoio técnico dos médicos veterinários da Faculdade Pio Décimo, o meu muito obrigada à Prof^a. Mônica Cristiane Paiva de Oliveira Caldas, pelo direcionamento inicial na metodologia com cães; Prof. Pablo Hoentszh Langvidey, pela forma prestativa com que sempre me recebeu; Prof. Marcelo Neres Oliveira, pelos procedimentos anestésicos.

Meu agradecimento, em especial, ao Prof. Márcio de Castro Menezes, médico veterinário e professor da Faculdade Pio Décimo pela arrebatção científica, sob cuja supervisão e acompanhamento clínico deu-se a realização deste experimento e pela participação entusiasmada dos seus alunos na assistência para com os animais, aos quais espero que o experimento tenha contribuído como incentivo à iniciação científica.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, por ter me acolhido como sua orientada; por seus esforços, trabalho e reflexões, os quais foram fundamentais para a realização e finalização desta pesquisa científica; pelo entusiasmo para com este projeto; pelos momentos agradáveis e alegres de convívio; por sua dedicação, incentivo, compreensão e, acima de tudo, amizade.

À Prof^a Dr^a Maria Amália Gonzaga Ribeiro, Prof^a Sandra Regina Barreto e futuros colegas Daniel Souza Campos e Felipe Góis Prado pela participação efetiva e descontraída nos experimentos com os roedores.

Ao Prof. Dr. Lauro Xavier Filho, pela intuição científica na aplicabilidade dos otólitos.

Ao Prof. Dr. Allan Ulisses Carvalho de Melo, meu afilhado, pela colaboração, disponibilidade e amizade, não só na realização deste experimento, mas na vida.

Ao Prof. Dr. José Mondelli pela sapiência, humildade e influência positiva que exerceu na minha formação e capacitação profissional.

Aos colegas e amigos José Aloysio Carvalho Oliveira e Denise Viana, da SODIC (Serviço Odontológico de Diagnóstico Computadorizado), pela contribuição com conhecimentos e recursos técnicos nas análises radiográficas e tomográficas.

À Prof^a. Dr^a Maria de Fátima Batista de Melo, do Centro de Imagem de Sergipe, pelos conhecimentos técnicos nas análises radiográficas.

A Magali, por todas as radiografias reveladas.

Aos colegas do mestrado, por terem sublimado com alegria o cumprimento de todos os créditos. A Leane, Simone, Elisano, Denisson, Valéria e Maíra, um beijo no coração.

Enfim, a todos os que, mesmo não sendo mencionados, de alguma forma participaram, contribuíram, torceram e são estímulos em minha vida para que eu, hoje, aqui estivesse. A todos pela maneira fraterna com que sempre se relacionaram comigo, minha profunda gratidão, por tudo o que me ofereceram e contribuíram para minha formação pessoal, acadêmica e profissional.

Meu muito obrigada!

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – DISSERTAÇÃO MESTRADO EM SAÚDE E AMBIENTE

1 - INTRODUÇÃO	02
2 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	04
3 - METODOLOGIA	25
3.1 - Obtenção do preparado de otólitos	25
3.1.1 - Medida do pH dos otólitos	25
3.2 - Experimentação em animais	25
3.3 - Procedimentos de experimentação animal	29
3.3.1 - Procedimentos de dentisteria	29
3.3.2 - Procedimentos de extração dentária	31
3.4 - Procedimentos de análise imaginológica	31
3.4.1 - Análise radiográfica	31
3.4.2 - Análise tomográfica	32
3.5 - Análise morfológica dos espécimes	33
3.6 - Procedimentos de análise dos dados	34
4 - RESULTADOS	35
5 - DISCUSSÃO	43
6 - CONCLUSÕES	50
7 - REFERÊNCIAS	51
ANEXOS	59
Anexo I: Parecer do Comitê de Ética da Universidade Tiradentes	60
Anexo II: Parecer do Comitê de Ética da Faculdade Pio Décimo	62
Anexo III: Solicitação para cessão dos cães ao Secretário Municipal de Saúde	63
Anexo IV: Solicitação ao Diretor da Faculdade Pio Décimo de parceria para o financiamento da pesquisa	64
Anexo V: Extração dos otólitos/trituração/diluição em 100ml de água destilada para aferir pH	66
Anexo VI: Resultado da aferição do pH	66
Anexo VII: Esterilizadora	66
Anexo VIII: Radiopacidade do otólito	67
Anexo IX: Cavidade oral canina	67
Anexo X: Profilaxia oral	67
Anexo XI: Isolamento absoluto da cavidade por arcada	68

Anexo XII: Preparos cavitários padronizados/Sangramento pulpar	68
Anexo XIII: Inserção do material de proteção pulpar na cavidade/Material protetor	69
Anexo XIV: Remoção do excesso do material protetor	69
Anexo XV: Selamento cavitário com ionômero de vidro	69
Anexo XVI: Extração do dentes para análise morfométrica	70
Anexo XVII: Dentes extraídos	70
Anexo XVIII: Dentes extraídos montados no elastômero para tomografia	70
Anexo XIX: Tomografia das arcadas	71
Anexo XX: Imagem tomográfica comprovando ausência ou presença de barreira mineralizada	71
Anexo XXI: Imagem radiográfica de espécimes após conclusão do experimento	72
Anexo XXII: Visualização macroscópica de barreira mineralizada	72
Anexo XXIII: Achados anatomopatológicos após 21 dias do experimento	73
Anexo XXIV: Achados anatomopatológicos após 30 dias do experimento	73

CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO

PÁGINA DE ROSTO	75
ABSTRACT	76
DESCRIPTORS	76
1 - INTRODUCTION	77
2 - MATERIAL AND METHODS	78
2.1 - Obtaining of the Otoliths Preparation	78
2.2 - Operative procedures	78
2.3 - Imaginological Study	79
2.4 - Histological Processing And Morphological Analysis	80
2.5 - Statistical Analysis	80
3 - RESULTS	80
4 - DISCUSSION	86
5 - CONCLUSIONS	88
6 - REFERENCES	89
ANEXO: Instruções aos autores – Periódico: Journal of Applied Oral Science	92

CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO

1 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	98
---------------------------------	----

RESUMO:

O capeamento pulpar direto é um procedimento que consiste na adequada proteção do tecido pulpar exposto ao meio oral, com o intuito de selar este local de infiltração bacteriana, preservar sua vitalidade e suas funções reparadora, nutritivas, sensoriais, proteção e de formação de barreira mineralizada. Otólitos são concreções calcárias encontradas no ouvido interno dos peixes ósseos, constituídos por uma grande variedade de compostos inorgânicos e de proteínas colagênicas de alto peso molecular, aparentemente relacionadas ao processo de calcificação de tecidos duros humanos. Este estudo avaliou a resposta da polpa dental de cães ao capeamento com otólitos, hidróxido de cálcio ou selamento com ionômero de vidro. Para tanto, dois cães foram anestesiados e após profilaxia e isolamento absoluto do campo operatório, realizou-se exposição padronizada experimental da polpa dos incisivos, capeamento e selamento cavitário com cimento de ionômero de vidro. Posteriormente, os 24 dentes foram divididos em três grupos, de acordo com o material capeador utilizado: preparado de otólitos (OTL), hidróxido de cálcio (HC) e nenhum material de proteção (CTR). Passados 21 e 30 dias do experimento, os animais foram anestesiados, os dentes extraídos e submetidos à tomografia computadorizada volumétrica de feixe cônico com tecnologia cone beam, radiografados e processados para a análise histomorfológica. Os otólitos apresentaram biocompatibilidade com os tecidos pulpaes *in vivo* e a resposta do tecido pulpar no grupo OTL foi semelhante a do grupo HC. Além disso, a presença de barreira mineralizada com aspecto de tecido dentinário foi observada em 100% dos espécimes do grupo HC, enquanto que, 83,3% dos espécimes do grupo OTL apresentou uma barreira com aspecto osteóide vedando a área exposta. Não ocorreu formação de tecido mineralizado no CTR, quer em 21 ou em 30 dias. Não houve diferença estatisticamente significativa entre OTL e HC ($p < 0,05$) para os períodos estudados. Conclui-se que o capeamento direto com o preparado de otólitos, similar ao hidróxido de cálcio, preserva a vitalidade pulpar, estimula a formação de barreira de tecido mineralizado e induz a resposta pulpar reparadora, representando um promissor biomaterial para ser utilizado na odontologia.

DESCRITORES: Otólitos; Capeamento da polpa dentária; Materiais biocompatíveis; Hidróxido de cálcio; Cavidade pulpar dental.

ABSTRACT:

Direct pulp capping is a procedure that comprises adequate protection of the pulp tissue exposed to the oral environment, in order to seal this spot against bacterial leakage, and preserve the pulp vitality as well as its nutritional, sensory, protection and formation of tissue barrier mineralized functions. Otoliths are calcareous concretions found in the inner ear of bony fishes, constituted of a wide range of inorganic compounds and high-molecular weight collagenous proteins apparently related to the human hard tissues calcification process. This study evaluated the response of the dental pulps of dog teeth to capping with otolith, calcium hydroxide or sealed glass ionomer cement. Therefore, two dogs were anesthetized and, after placement of a rubber dam, the dental pulps the incisors were experimentally exposed in a standardized manner, capping and the cavities were then sealed with glass ionomer cement. Subsequently, twenty four teeth were assigned into three groups, according to the capping material employed: otoliths preparation (OTL), calcium hydroxide (HC) and no protective material was used in the third group (CTR). Twenty-one and 30 days after the experiment, the animals were anesthetized, the teeth were extracted and subjected to cone-beam computerized tomography, X-rayed and prepared for histomorphological analysis. The otoliths showed biocompatibility with the pulp tissue *in vivo* and the response of pulp tissue in OTL was similar to those produced in HC. Besides, mineralized barrier with dentin-like appearance was observed in 100% HC, whereas 83.3% of OTL formed an osteoid barrier sealing the spot area. No hard tissue formation was seen in CTR either in 21 or in 30 days. There was no statistically significant difference between OTL and HC ($p < 0.05$) for the periods studied. It's concluded that the direct capping with otoliths is capable of preserve pulp vitality, stimulate the formation of mineralized tissue barrier and inducing the reparative pulp response, and hence work as a promising pulp capping biomaterial to be used in the odontology.

DESCRIPTORS: Otoliths; Dental pulp capping; Biocompatible Materials; Calcium hydroxide; Dental pulp cavity.

CAPÍTULO I

DISSERTAÇÃO MESTRADO EM SAÚDE E AMBIENTE

1 - INTRODUÇÃO:

O desenvolvimento de novos materiais e a adaptação destes ao meio biológico conduziram a uma evolução das pesquisas sobre os biomateriais, o que tem melhorado a qualidade de vida dos seres humanos. Atualmente, a regeneração e a recuperação de tecidos mineralizados são objetos de pesquisas e têm despertado interesse em muitos centros de estudos médicos e odontológicos, com o objetivo de evitar os traumas cirúrgicos e melhorar a adaptação dos biomateriais no interior do corpo humano (MORETTI NETO et al, 2008).

Dentre esses materiais destacam-se os biomateriais à base de fosfato de cálcio, em razão da semelhança química, mineralógica e cristalográfica à do esqueleto humano, o que favorece a biocompatibilidade e regeneração de tecidos duros. Estes biominerais vêm tomando um espaço importante em aplicações biomédicas em razão de suas características mineralógicas semelhantes às apatitas da estrutura óssea e dentária do esqueleto humano, e também por apresentarem boa biocompatibilidade (ANDRADE & DOMINGUES, 2006).

Biominerais são compostos constituídos por uma fase inorgânica rica em minerais associados à dinâmica da calcificação dos tecidos duros do organismo, fixados em uma matriz orgânica, geralmente de natureza proteica, sintetizados em condições ambientais (LOWENSTAM & WEINER, 1989; PERRY et al, 2009).

Os otólitos são estruturas calcárias localizadas no ouvido interno dos peixes ósseos que funcionam como órgãos de equilíbrio (CAMPANA & THORROLD, 1984). Estudos vêm demonstrando que os otólitos (OTL) são ricos em carbonato de cálcio (CaCO_3), elementos metálicos como estrôncio (Sr), bário (Ba), magnésio (Mg), cádmio (Cd), cobalto (Co), cobre (Cu), zinco (Zn), sódio (Na) e potássio (K), assim como não metálicos como silício (Si), fósforo (P), enxofre (S), boro (B) (CAMPANA & NEILSON, 1984), bem como em proteínas colagênicas de alto peso molecular (MURAYAMA et al, 2002; MURAYAMA et al, 2004; TOHSE et al, 2008). Devido à sua composição química, é possível supor que este material possa funcionar como um biomineral.

Diante do exposto, constituiu proposição do presente trabalho investigar o papel de otólitos de *Cynoscion acoupa* (LACEPÉDE, 1801), um peixe ósseo abundante em toda a costa brasileira, como adjuvante biomineral em experimentos de neoformação de barreira mineralizada em polpas dentais de cães experimentalmente expostas. Para tanto, esta pesquisa foi subdividida em três capítulos: no primeiro, apresentou-se a dissertação de mestrado na qual aduziu-se um estudo sobre o papel dos otólitos na formação da barreira dentinária em incisivos de cães (*Canis lupus familiaris*) após exposição pulpar induzida e por se tratar de um estudo experimental pioneiro, realizou-se uma revisão de literatura sobre o tema, a fim de prover um cabedal teórico que permitisse a fundamentação dos estudos experimentais posteriores, bem como detalhou-se a metodologia, os resultados e a discussão dos mesmos; no segundo capítulo, redigiu-se, em inglês, um manuscrito científico intitulado “A novel promising natural product for direct dental pulp capping based on *Cynoscion acoupa* otoliths: experimental study in canine model” para submissão ao corpo editorial do Journal of Applied Oral Science; no terceiro e último capítulo, são tecidas as considerações finais, onde se discutem o papel dos otólitos como biomineral e as perspectivas de pesquisas futuras, além da inserção destes estudos no contexto interdisciplinar da interrelação saúde e ambiente.

2 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA:

Pescada é uma designação comum a diversos tipos de peixes teleósteos e, no Brasil, a maioria pertence à ordem perciformes, da família dos cienídeos, especialmente os do gênero *Cynoscion*. A pescada-amarela, *Cynoscion* acoupa, uma espécie da família *Sciaenidae*, é um importante recurso pesqueiro mundial com cerca de 70 gêneros e 270 espécies, amplamente distribuído nos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico, ocorrendo principalmente em águas marinhas e estuarinas. Na América do Sul, é encontrada em águas tropicais e subtropicais da costa atlântica e no Brasil em todo o litoral. Esta espécie é nectônica (movimenta-se ativamente nas águas dos oceanos), demersal (vive a maior parte do tempo em associação com o substrato) e costeira de águas rasas, comum nas águas salobras dos estuários, lagoas estuarinas, desembocaduras dos rios e podem penetrar na água doce. Alimenta-se principalmente de peixes e crustáceos, habita áreas de lodo, areia ou cascalho e é a maior espécie do gênero no Brasil. Reproduz-se na primavera e no verão e as larvas se desenvolvem em águas rasas e de baixa salinidade (MATOS & LUCENA, 2006).

Dentre as estruturas rígidas do *Cynoscion* acoupa encontram-se os otólitos, que são estruturas cristalinas constituídas por concreções de carbonato de cálcio sob a forma mineral de aragonita, embutidas numa matriz proteica. Situados no ouvido interno dos peixes, os otólitos são responsáveis pela manutenção do equilíbrio na coluna de água e sentido de orientação, em conjugação com o sistema de linha lateral (FALINI et al, 2005). Estas estruturas depositam regularmente anéis de crescimento, que permitem identificar alterações anuais, sazonais e diárias no seu crescimento. Assim, desde a sua primeira utilização no final do século XIX, os otólitos dos peixes são profusamente empregados para alcançar uma gestão eficiente das pescas, baseada na análise química dos otólitos para a estimativa clássica das idades dos peixes, a determinação de locais de nascimento e de padrões migratórios, a detecção de eventos importantes no ciclo de vida dos peixes, tais como: alimentação exógena, metamorfose, delimitação de unidades populacionais (stocks) e reprodução são algumas das muitas aplicações possíveis (VAZ-DOS-SANTOS et al, 2007).

Os peixes ósseos possuem três pares de corpos inorgânicos, comumente chamados de otólitos, localizados de cada lado da cabeça, na base dos canais semicirculares, em bolsas chamadas de *utrículus*, *sacculus* e *lagena*, cada uma com um par de estruturas mineralizadas: *lapillus*, *sagitta* e *asteriscus*, respectivamente. Estas estruturas são compostas por cristais de carbonato de cálcio (aragonita) e material orgânico (proteínas) e, devido a algumas das suas características (dimensões, especificidade morfológica, acessibilidade, composição química, microestrutura, fase da ontogenia em que são formados e modo de crescimento), e à dependência em relação à variação dos fatores do meio em que o animal vive, encontram-se atualmente entre as peças anatômicas dos peixes que maior utilidade têm e cujo estudo um maior número de aplicações práticas permite. O maior par, o *sagittae*, sinônimo de otólito, é utilizado rotineiramente para a determinação da idade em populações de peixes (FALINI et al, 2005; SOUZA et al, 2009).

O crescimento dos otólitos se dá pela aposição concêntrica de uma matriz orgânica rica em proteínas colagênicas de alto peso molecular e carbonato de cálcio, formando anéis de crescimento que podem ser observados ao se analisar um corte transversal da estrutura. Os otólitos são quimicamente formados extracelularmente pela cristalização do carbonato de cálcio - CaCO_3 (essencialmente na forma de aragonita - mas também de calcita ou vaterita), numa matriz proteica colagênica (proteína do tipo queratina, designada por otolina-1) e crescem pela adição de camadas concêntricas de carbonato de cálcio e de proteína (DEGENS et al, 1969; FALINI et al, 2005).

A matriz de otólitos é formada por duas proteínas, uma solúvel e outra insolúvel em EDTA, denominadas, respectivamente, proteína de matriz de otólitos-1 (OMP-1) e otolina-1 (MURAYAMA et al, 2005). A OMP-1 apresenta 40% de homologia com a porção C-terminal da melanotransferrina humana que parece desempenhar algum papel no metabolismo do ferro. A otolina-1 é uma proteína colagenosa pertencente à família do colágeno VIII e X. A OMP-1 é sintetizada por células epiteliais localizadas na porção externa da mácula sensoria do sáculo (câmara do ouvido interno do peixe), enquanto a otolina-1 é produzida por grupos restritos de células cilíndricas localizadas na zona marginal do epitélio sensorial (MURAYAMA et al, 2004). Aproximadamente metade das macromoléculas da matriz

dos otólitos é insolúvel em água e presumivelmente estão envolvidas no processo de mineralização desta estrutura utilizando carbonato de cálcio (FALINI et al, 2005).

Otólitos são ricos em carbonato de cálcio, elementos metálicos (Sr, Ba, Mg, Cd, Co, Cu, Zn, Na, K) e não-metálicos (Si, P, S, B) (CAMPANA & NEILSON, 1984), bem como em proteínas colagênicas de alto peso molecular (proteína de matriz de otólitos-1 (OMP-1) e otolina-1) (MURAYAMA et al, 2002; MURAYAMA et al, 2004, MURAYAMA et al, 2005), além de carboidratos e lipídios (DEGENS et al, 1969). A composição da endolinfa dos otólitos é um fator importante para o crescimento dos mesmos e esta endolinfa é saturada com íons de cálcio e bicarbonato e sua composição e a presença de microambientes alcalinos são fundamentais para calcificação dos otólitos, sendo necessários para promover a precipitação do carbonato de cálcio (TOHSE et al, 2008).

É possível que a otolina-1, porção orgânica de natureza proteica dos otólitos, possa representar o local de nucleação para precipitação de cristais de carbonato de cálcio (ROMANECK & GAULDIE, 1996). Deste modo, conquanto agregados de otolina-1 se assemelham quimicamente a moléculas de colágeno, é possível que possam atuar como sítios para nucleação de depósitos cálcicos e facilitar o processo de mineralização (MURAYAMA et al, 2002).

Estudos têm demonstrado que os domínios C-terminais da otolina-1 têm alta homologia com os mesmos domínios observados no colágeno tipo VIII e X representados por 74 unidades repetidas de aminoácidos (GLY-X-Y), com três pontos de interrupção (sequências curtas de repetições imperfeitas) (MURAYAMA et al, 2002). O colágeno tipo VIII é encontrado frouxamente disperso em membranas basais em diferentes tecidos, enquanto que o colágeno X é observado apenas na matriz proteica da zona hipertrófica da cartilagem hialina presente em placas epifisárias de crescimento. Moléculas de colágeno tipo VIII e X parecem estar associadas ao processo de mineralização de matrizes proteicas não calcificadas (SUTMULLER et al, 1997).

Tem sido sugerido que o mecanismo de mineralização dos otólitos em peixes esteja intimamente relacionado à participação de moléculas de colágeno, de maneira similar àquela deflagrada para calcificação dos ossos e dentina. O principal constituinte dos ossos e dentina é o colágeno fibrilar, enquanto que dos otólitos é a otolina-1, uma molécula singular pertencente à família das proteínas colagênicas de

cadeia curta que se organizam em tramas. Desta forma, a otolina-1 poderia promover a formação mineral utilizando carbonato de cálcio da mesma forma que o colágeno propicia a calcificação em ossos e dentina utilizando o fosfato de cálcio (MURAYAMA et al, 2002).

A presença de matriz orgânica acelera a calcificação de constituintes proteicos por facilitar a incorporação de minerais por difusão passiva, de modo que a composição química dos constituintes orgânicos proteicos dos otólitos pode representar o elemento-chave para a dinâmica da calcificação destas estruturas anatomofisiológicas (BORELLI et al, 2003).

Adicionalmente, o CaCO_3 , principal constituinte inorgânico dos otólitos (TOHSE et al, 2008), vem sendo apontado em alguns estudos como agente biomineral reabsorvível. Apesar do CaCO_3 não ser observado em tecidos duros de vertebrados, ele é o principal componente estrutural de invertebrados, e, portanto, tem sido postulado para este composto uma provável atividade biomineral se combinado ao colágeno. Gelatina (unidades de atelocolágeno que não sofreram fibrilogênese) e colágeno dissolvido vêm sendo utilizados como substratos no intuito de investigar os seus efeitos sobre a cristalização induzida por CaCO_3 e, portanto, seu papel como biomaterial inorgânico (OLSZTA et al, 2003, OLSZTA, 2004).

Biomateriais inorgânicos são compostos alternativos ao uso de enxertos ósseos autógenos por serem produzidos com propriedades potencialmente semelhantes às do tecido receptor e, quando usados em defeitos ósseos longos, constituem elementos capazes de promover ou auxiliar a neoformação óssea por mecanismos de osteoindução e/ou osteocondução (SERVICE, 2000).

Um importante fator a ser considerado na pesquisa de novos biomateriais refere-se à grande biodiversidade brasileira que abriga hoje entre 15 a 20% das espécies vegetais, animais e de microorganismos do mundo. Apesar do crescente interesse internacional pela megabiodiversidade brasileira, sabe-se que ela por si só não é garantia de crescimento econômico, tampouco de desenvolvimento sustentável se pesquisas que comprovem a eficiência científica do produto não forem desenvolvidas. Espera-se que o Brasil, além de importante exportador de matéria-prima, invista em pesquisas e converta-se no protagonista de uma nova economia mundial, baseada no uso sustentado da biodiversidade e dos seus recursos derivados, agregando valor para os diferentes setores produtivos (RECH, 2008).

Recentemente, muitos estudos foram realizados na tentativa de melhorar a regeneração óssea usando a implantação de diversos tipos de biomateriais (FINKEMEIER, 2002). Dentre os biomateriais com provável atividade sobre a neoformação óssea, merece destaque o grupo dos biominerais. Estes representam tecidos duros que consistem basicamente de compostos inorgânicos e, entre suas funções, cita-se a manutenção da estrutura corporal, proteção, estocagem de minerais, entre outras (MANN, 2002).

Os biominerais são uma alternativa de classe de biomateriais capazes de induzir ou melhorar a formação óssea em substituição ao enxerto autógeno, quando aplicado em defeitos ósseos de grandes dimensões (SERVICE, 2000; BORRELLI et al, 2003). Eles consistem de uma fase predominantemente mineral incorporada a uma matriz orgânica que, de maneira geral, compõe de 0,01 a 10% de seu peso total. A matriz orgânica, por sua vez, é representada por uma rede complexa de glicoproteínas, proteoglicanas e proteínas colagênicas e não colagênicas e desempenha um papel fundamental nos vários estágios do processo de mineralização do osteóide durante a neoformação óssea (LOWENSTAM & WEINER, 1989; PERRY et al, 2009). Borelli et al (2003) demonstraram que a presença de uma matriz orgânica acelera a neoformação óssea por facilitar a incorporação de minerais por difusão passiva.

Adicionalmente, a utilização de produtos naturais com características físico-químicas de biomineral vem sendo alvo de numerosos estudos no campo da engenharia de materiais, particularmente voltados para o aprimoramento do processo de biomineralização à base de carbonato de cálcio (OLSZTA et al, 2003; OLSZTA, 2004).

De modo geral, todo material a ser utilizado em sistemas orgânicos, humanos ou não, precisa ser biocompatível. Nos últimos anos, uma ampla gama de novos materiais com potencial atividade biológica vem sendo reportada na literatura, de modo que pesquisas avaliando suas propriedades quando em contato com tecidos biológicos e sua viabilidade comercial são cada vez mais demandadas (MORETTI NETO et al, 2008).

Atualmente, a recuperação de tecidos calcificados perdidos em resposta aos mais diversos tipos de injúrias tem sido alvo de numerosas pesquisas, com o intuito de evitar ou minimizar traumas cirúrgicos e melhorar a adaptação dos biomateriais no

interior do corpo humano (PEREIRA et al, 1999). Dentre estes novos materiais, os biominerais ricos em fosfato de cálcio, em razão da semelhança química, mineralógica e cristalográfica à do esqueleto humano, o que vem favorecer não apenas a regeneração dos tecidos duros, mas também a biocompatibilidade do material (ANDRADE & DOMINGUES, 2006).

De acordo com Silveira et al (2004), a biocompatibilidade pode ser definida como a relação entre um material e o organismo de modo a não produzir efeitos indesejáveis e engloba vários aspectos do material, incluindo uma análise de suas propriedades físicas, mecânicas e químicas até seu potencial citotóxico, alergênico e mutagênico, não apresentando efeitos tóxicos ou causando injúrias na função biológica. Um biomaterial é qualquer substância, exceto medicamentos, que pode ser usado por qualquer período de tempo como parte de um sistema que objetive o tratamento ou a reposição de qualquer tecido, órgão ou função do corpo.

O conselho de materiais dentários da AMERICAN DENTAL ASSOCIATION (ADA) (1972) padronizou os testes de toxicidade para avaliação dos efeitos biológicos dos materiais de uso odontológico. Estes testes foram subdivididos em três grupos: nível I - que corresponde aos testes primários para análise de citotoxicidade e potencial irritante; nível II - testes secundários para averiguar a citotoxicidade sistêmica em animais por meio de implantes subcutâneos; nível III - para o uso pré-clínico, no qual são observadas as reações teciduais para então haver a inserção do material em dentes humanos.

Nos últimos anos, a biocompatibilidade de diferentes biomateriais com características biominerais de uso odontológico vem sendo testada, tais como o agregado de trióxido mineral (MTA) e cimento de Portland (BARBOSA et al, 2009). Para avaliação da biocompatibilidade de biomateriais, implantes subcutâneos em ratos têm sido considerados como uma primeira triagem em avaliações *in vivo*, embora implantes mais complexos depois possam ser testados em animais maiores com o intuito de simular as condições reais do material implantado e, para tanto, enxertos ou próteses devem ser utilizados (MAIZATO et al, 2008).

Após a segunda guerra mundial, manifestações internacionais foram fundamentais para o reconhecimento dos direitos sociais, entre eles o direito à saúde. A sociedade internacional passou a questionar as condições humanas de vida e a

necessidade de garantia efetiva dos direitos humanos reconhecidos, em 1948, através da Declaração Universal dos Direitos Humanos. No Brasil, a Constituição Federal de 1988, seguindo o exemplo da Organização Mundial de Saúde reconhece a saúde como um direito fundamental e com a constitucionalização desse direito, ao Estado foi imposta a execução de políticas públicas de saúde que, de modo universal e igualitário, garanta a todos o direito à saúde. No entanto, de forma paradoxal, pela sua própria extensão e complexidade, essa estrutura vem se mostrando ineficaz. Seu funcionamento demanda alto custo, há falta de investimentos e uma série de elementos pode ser apontada como causa de falência dessa estrutura, caracterizando uma afronta ao direito fundamental à saúde (SOUZA et al, 2008).

Quanto à saúde bucal no Brasil, embora o quadro epidemiológico da população jovem brasileira venha se modificando nas últimas décadas, a assistência ainda é precária. Segundo dados do Ministério da Saúde, coletados em três grandes levantamentos epidemiológicos, nos anos de 1986, 1996 e 2003, houve uma diminuição significativa do índice de cárie da população brasileira. Nestes levantamentos, a distribuição dos indivíduos examinados em relação à prevalência de cárie teve como base índices que indicam o número de dentes cariados (C), perdidos (P) (extraídos e com extração indicada) e restaurados (O), CPO-D para dentes permanentes e ceo-d para dentes decíduos (RONCALLI, 2005; BRASIL, 2000; BRASIL, 2004).

No Brasil, vários autores identificam condições inadequadas de saúde bucal na população, com altos índices de CPO-D e elevadas frequências de edentulismo (ROSA et al, 1992; FRARE et al, 1997), permitindo identificar condições precárias de saúde bucal da população brasileira que denotam atenção odontológica reduzida ou baseada em práticas não conservadoras em etapas anteriores da vida do indivíduo (SILVA & VALSECKI JÚNIOR, 2000).

As perdas dentárias acarretam sérios problemas. Afetam a mastigação e a digestão de alimentos (dificultando cortá-los, triturá-los e moê-los), acabando por sobrecarregar o estômago e o intestino, podendo causar sérios danos. Afetam ainda a fonação, levando a dificuldade em pronunciar determinadas letras e sílabas das palavras. Por fim, comprometem a estética, a aparência pessoal e a autoestima do indivíduo. E, considerando que uma pessoa com todos os dentes tem capacidade mastigatória de 100%, pessoas que usam próteses totais apresentam capacidade de 25%. Assim, a mastigação afetada pelas extrações pode ser limitadamente recuperada pelo uso de próteses (MORIGUCHI, 1992).

Os dados a respeito da realidade epidemiológica brasileira em saúde bucal são oriundos de três grandes levantamentos conduzidos pelo Ministério da Saúde (MS) e consolidados em 1986, 1996 e 2003. Eles revelam que o Brasil avançou muito na prevenção e no controle da cárie em crianças; contudo, a situação bucal de adolescentes, adultos e idosos está entre as piores do mundo (BRASIL, 2004).

A alta incidência e prevalência da doença cárie, a destruição do órgão dental por processos mecânicos ou traumáticos são frequentes, acarretando, por vezes, a ocorrência de pequenas exposições do tecido pulpar. Sabe-se que, dependendo do estágio de inflamação presente no tecido pulpar, este é passível de recuperação mediante terapias conservadoras. O tratamento conservador da polpa consiste em protegê-la, aplicando localmente substâncias que atuam de forma a estimular respostas reacionais do tecido, fazendo com que ele forme uma barreira de dentina, selando a área exposta (MONDELLI, 1998).

Lesões traumáticas e cáries dentárias são os maiores desafios para a integridade e o término do desenvolvimento apical radicular dos dentes. Ambas podem causar injúrias à polpa dental e submetê-la a danos irreversíveis, causando necrose do tecido pulpar e, em pessoas jovens, podem comprometer o desenvolvimento do ápice radicular (WITHERSPOON et al, 2006).

A preservação da vitalidade pulpar durante procedimentos restauradores é uma das maiores preocupações da dentística restauradora. Algumas pesquisas têm demonstrado que alterações da polpa a diferentes materiais restauradores foram relacionadas à presença de bactérias e à existência de microinfiltração. Além disso, atestam que a principal causa de falha no tratamento pulpar tem sido atribuída mais à infecção decorrente da contaminação bacteriana do que às propriedades irritantes dos materiais de proteção pulpar, comumente utilizados. Se esta hipótese é válida, a cura da polpa poderia ser esperada se o material aplicado selasse completamente a cavidade, evitando a microinfiltração (TORRES et al, 2000).

Dentina e polpa são consideradas um órgão único, denominado complexo dentinopulpar, devido à íntima relação entre a camada de células da periferia da polpa e seus prolongamentos dentro dos túbulos dentinários (KITASAKO et al. 1999). A dentina é um tecido mineralizado, de natureza conjuntiva, que constitui a maior parte da estrutura do dente, além de dar suporte ao esmalte que a reveste em sua porção coronária. O conteúdo inorgânico da dentina consiste, principalmente, de hidroxiapatita e o colágeno

tipo I compõe a maior parte da fase orgânica. Além disso, a dentina contém proteínas não colagenosas, como glicoproteínas, proteoglicanas e fosfoproteínas, além de água (LINDE, 1985).

A principal função da polpa dental é produzir dentina e em sua função formadora e reparadora, através dos odontoblastos (célula formadora de dentina), produz matriz orgânica e promove sua calcificação, formando dentina tubular, com o desenvolvimento gradativo dos processos odontoblásticos (MODENA et al, 2009).

A polpa proporciona nutrição à dentina através dos prolongamentos odontoblásticos, os quais conduzem os elementos nutritivos encontrados no líquido tecidual. Este fluido dentinário torna a dentina úmida, resiliente e menos friável. A polpa também exerce a função defensiva e de proteção ao dente através de suas funções sensoriais, manifestando-se através da dor, mediante estímulos físicos e químicos, capacitando o indivíduo a perceber alterações na superfície do dente através de fibras nervosas (MONDELLI, 1998, MODENA et al, 2009).

O material ideal para o tratamento pulpar deve resistir à infiltração bacteriana e estimular o tecido pulpar a retornar a um estado saudável, promovendo a formação de dentina (WITHERSPOON et al, 2006).

A inflamação é uma resposta complexa desencadeada em tecidos vascularizados devido a agressões provocadas por agentes lesivos (SALVEMINI et al, 1996) e esta resposta leva a um maior aporte sanguíneo e ao acúmulo de fluídos e células nos tecidos extravasculares, fazendo com que haja reparo tecidual (STAMP et al, 2004). Na polpa dental, agentes físicos, biológicos ou químicos podem desencadear processos inflamatórios graves, com comprometimento do tecido pulpar (CASTILHO et al, 2008).

O capeamento pulpar ou a proteção pulpar direta, alternativa conservadora de tratamento, consiste na remoção de uma pequena porção da polpa dental coronária exposta ao ambiente oral, com o objetivo de remover o tecido inflamado ou infectado. Tem como finalidade facilitar a cura da polpa através da estimulação do tecido pulpar pelo material capeador, preservando sua vitalidade, produzindo tecido calcificado e selando a área de exposição, controlando a microinfiltração e a penetração de bactérias e de seus produtos. Além disso, o material capeador deve ser completamente reabsorvido e não afetar a vitalidade do tecido pulpar (TORRES et al, 2000).

Este tratamento é indicado quando a polpa é mecânica e acidentalmente exposta durante o preparo da cavidade e encontra-se num estágio reversível de recuperação. Para tanto, os critérios clínicos de sucesso são ausência de dor ou sensibilidade, ausência de fístula e de mobilidade dentária patológica que confirmam a manutenção da vitalidade pulpar. Os critérios radiográficos correspondem à ausência de reabsorções internas e externas e de enfermidades interradiculares. Com relação à técnica, a ausência de tecido cariado circunvizinho à polpa no momento da exposição e a não formação de coágulo após o controle do sangramento também são fatores essenciais para o êxito da proteção pulpar direta (MONDELLI, 1998).

Do ponto de vista biológico, a preservação da vitalidade pulpar é muito importante para a manutenção das atividades fisiológicas dos dentes (HOLLAND et al, 2006). Neste sentido, Estrela & Figueiredo (2001) afirmaram que o selamento dentinário representa uma etapa de extrema relevância na proteção pulpar direta, uma vez que visa a impedir a penetração de microorganismos, promovendo isolamento térmico e químico-mecânico frente aos materiais tóxicos injuriantes ao tecido pulpar.

A proteção pulpar direta convencional deve ser realizada imediatamente depois de ocorrida a exposição, já que a polpa contaminada pela cárie ou exposta à flora bucal por longos períodos tem probabilidade de sucesso do capeamento direto significativamente diminuída (MONDELLI, 1998).

Durante muito tempo, a possibilidade de tratar, com êxito, a polpa dentária inflamada foi encarada com muita reserva pela maioria dos autores. Porém, vários trabalhos demonstraram que a polpa dentária inflamada é perfeitamente passível de ser tratada e preservada (BRISO et al, 2006; TORRES et al, 2000; QUEIROZ et al, 2005; MARION et al, 2005).

O sucesso de uma proteção pulpar direta que culmina com a formação de uma barreira calcificada para vedar a exposição e manter a vitalidade pulpar está condicionado a técnicas operatórias ideais, tais como: isolamento absoluto do campo operatório, polpa e local da exposição livres de contaminação bacteriana; idade do paciente; tamanho da exposição; agente capeador e vedamento do dente e da condição pulpar do dente (MONDELLI, 1998).

Indivíduos mais velhos têm fibrose aumentada e um suprimento sanguíneo diminuído, depósito de cálculos pulpares que reduzem o estroma pulpar e, em função

disto, capacidade reduzida de resposta aos microorganismos e de reparo biológico (MONDELLI, 1998).

O primeiro relato sobre o tratamento conservador da polpa dental exposta data de 1756, quando Pfaff recomendou a proteção pulpar com folha de ouro. Desde então, várias outras substâncias foram recomendadas para aplicação direta sob o tecido pulpar, com ênfase para o pó de dentina, indicado, em 1879, por Stellwagen. Também deve ser mencionada a primeira recomendação para remover parte da polpa coronal preconizada por Allport, em 1866, e a primeira pulpotomia, preconizada por Witzel, em 1874. A pulpotomia envolve a amputação da porção coronária da polpa dentária infectada, preservando-se a vitalidade e função do remanescente pulpar radicular. Durante o período de 1756 a 1897, vários autores recomendaram o uso de diferentes substâncias para serem aplicadas diretamente sobre o tecido pulpar (HOLLAND et al, 2006).

No caso de exposição pulpar, são três os possíveis resultados, dependendo da agressão tecidual e da capacidade adaptativa das células pulpares às alterações do meio: necrose, quando as injúrias físicas, biológicas ou químicas excedem a capacidade adaptativa das células; reparação pulpar satisfatória com formação de tecido calcificado utilizando-se materiais inertes, que ocorre quando a vitalidade do tecido é adequada, as injúrias teciduais forem pequenas e a região foi adequadamente protegida da ação bacteriana; e diferenciação de células pulpares em células produtoras de tecido calcificado na presença de indutores, que ocorre quando se procede à aplicação de agentes bioativos sobre o tecido pulpar exposto (TORRES et al, 2000).

Dentes que apresentem características inflamatórias pulpares reversíveis são o requisito básico para a escolha de qualquer tratamento que tenha como objetivo a manutenção da vitalidade pulpar. Para isto, o diagnóstico do estado de inflamação pulpar, dado pela sensibilidade, textura, consistência (firme), coloração (vermelho vivo) e tipo de sangramento no momento da exposição são fundamentais para o sucesso do tratamento conservador (WIENANDTS et al, 2002).

Clinicamente, o tecido pulpar remanescente deve apresentar adequado fluxo sanguíneo, denotado por um sangramento vermelho rutilante, consistência resistente ao corte durante a amputação pulpar, sugestiva de ausência de degradação tecidual. Ou seja, deve possuir vitalidade suficiente para ser capaz de responder aos estímulos dos materiais capeadores. Outro fator importante é a presença de contaminação pulpar durante os procedimentos operatórios e o selamento da cavidade com os materiais

restauradores, já que a inflamação pulpar está intimamente relacionada com a presença de bactérias e seus subprodutos, devendo-se zelar pela manutenção da cadeia asséptica durante os procedimentos operatórios com o objetivo de facilitar a cura da polpa através da estimulação do tecido pelo material capeador (TORRES, et al, 2000).

Quanto maior for a capacidade de vedamento marginal que uma técnica restauradora possa proporcionar, menor será a possibilidade de resposta pulpar indesejável. Deste modo, as técnicas restauradoras adesivas, incluindo o emprego de condicionamento ácido da dentina, são adequadas para diminuir a formação de fendas interfaciais onde microorganismos possam se alojar, penetrar ou proliferar (MONDELLI, 1998).

Pesquisas revelam que o hidróxido de cálcio (HC) representa o material mais aceito para proteção pulpar direta. Tem sido descrito que, quando ele é colocado em contato com o tecido da polpa, preserva a sua vitalidade sem provocar resposta inflamatória, estimulando a formação de barreira de tecido dentinário mineralizado (BRISO et al, 2006; TORRES et al, 2000; QUEIROZ et al, 2005).

Os produtos à base de HC estão bastante difundidos e grandemente utilizados, graças às suas comprovadas propriedades de estimular a formação de dentina esclerosada, proteger a polpa contra os estímulos térmicos e a ação antibacteriana. Pela capacidade de estimular a formação de dentina reparadora quando colocadas sobre a polpa, a pasta de HC é principalmente indicada nos casos de proteção direta, curetagem pulpar e pulpotomias a fim de promover a formação de uma ponte dentina reparadora ou barreira calcificada. A indução ou o auxílio à neoformação dentinária parece ser decorrente do pH altamente alcalino do HC e de sua atividade antibacteriana. Quando a polpa dentária exposta encontra-se inflamada, a atuação do HC é reduzida drasticamente e, nessa condição, o emprego de corticosteróide e antibiótico, antes do emprego do HC, promove melhores resultados de cura pulpar (HOLLAND et al, 2006)

Apesar do sucesso na utilização da pasta de HC (HC pró-análise diluído em água destilada) no tratamento conservador da polpa, foi observado que suas propriedades físicas são bastante deficientes, principalmente a solubilidade em água e a consistência sem resistência mecânica por falta de processo de endurecimento. Deste modo, torna-se necessária a utilização de uma sobrebase intermediária de cimento de ionômero de vidro ou cimento de HC sobre a pasta de HC (MONDELLI, 1998).

A barreira de tecido mineralizado, induzida pelo hidróxido de cálcio, após a exposição pulpar em dentes humanos, isola a polpa estruturalmente do material utilizado nas restaurações, bem como passa a fazer parte do contexto fisiológico da polpa em questão, por apresentar-se inserida na estrutura da polpa, fazendo-a cumprir integralmente suas funções formadora, reparadora, sensorial e de defesa (ALCURE, 2001).

Contudo, sabe-se que o hidróxido de cálcio (HC) não é o único material capaz de estimular a resposta reparadora da polpa com a deposição de nova dentina ou a formação de ponte de dentina e que a formação de pontes de dentina é uma resposta intrínseca da polpa exposta quando há ausência de bactérias (BARBOSA et al, 2009).

A ideia de que a vitalidade da polpa dentária não deve ser apenas preservada, mas também incentivado o processo de reparação, pela formação de uma nova ponte de dentina que isola o restante da polpa vital do contato com substâncias estranhas presentes na cavidade bucal, foi histologicamente demonstrada. No entanto, a busca por materiais com melhores propriedades físicas e biológicas do que o HC foi contínua ao longo do século XX (ALBUQUERQUE et al, 2006).

Vários estudos realizados sobre o capeamento da polpa com HC pró-análise (HC PA) revelaram uma taxa de sucesso média de 96%. A literatura revela que essa elevada taxa resposta em polpas intactas é resultado da formação de uma ponte de dentina que protege o tecido pulpar remanescente com vitalidade. No entanto, os índices de sucesso parecem substancialmente menores quando a proteção foi realizada com cimento de HC (HOLLAND et al, 2006).

Tem sido demonstrado que a magnitude da resposta inflamatória determinada pela injúria pulpar constitui um fator relevante para o sucesso do tratamento conservador da polpa. Quando a inflamação do tecido pulpar foi discreta, a taxa de reparo foi de 85,7%. Por outro lado, quando a inflamação foi grave, algumas áreas superficiais de necrose foram observadas e a taxa de sucesso reduzida para 57,1% (HOLLAND et al, 2006).

Entre os procedimentos conservadores da polpa dentária inflamada, a pulpotomia é a técnica mais indicada e consiste na remoção da polpa coronária e posterior aplicação de um material sobre o remanescente pulpar. Uma vez mais, O HC parece ser o material mais utilizado para essa finalidade, visto que clínica e radiograficamente sua eficácia já

foi comprovada, induzindo a formação de uma ponte de tecido mineralizado e mantendo a vitalidade da polpa radicular (MARION et al, 2005; ALBUQUERQUE et al, 2006).

O mecanismo de ação do HC ainda vem sendo bastante estudado. Poucos minutos após o contato do tecido da polpa com esse material, há a formação de uma zona de necrose, alterando o estado físico-químico das substâncias intercelulares, através da ruptura de glicoproteínas que parece determinar a desnaturação proteica; posteriormente, logo no limite entre o tecido vivo e o necrótico há deposição de sais de cálcio, enquanto que a dentina é observada cerca de 15 dias após o capeamento. (ESTRELA & HOLLAND, 2003).

A utilização do HC tem sido criticada por causar necrose superficial quando colocado em íntimo contato com o tecido pulpar remanescente. Entretanto, as vantagens do emprego desse material nas pulpotomias também têm sido relatadas na literatura, uma vez que ele propicia a formação de tecido mineralizado, a apicigênese em dentes com rizogênese incompleta e a manutenção da vitalidade do dente, fatores estes que constituem os objetivos principais da pulpotomia. Além dos procedimentos técnicos da pulpotomia, o sucesso do tratamento depende de outros fatores essenciais, como um diagnóstico clínico e radiográfico criterioso e um correto e adequado selamento coronário a fim de que, por um período de tempo, as bactérias produtoras de ácido sejam privadas de sua fonte de nutrição e, como resultado, menos ácido seja gerado, o que pode permitir a remineralização dentinária (MARION et al, 2005).

Segundo Massara et al (1996), de acordo com o medicamento escolhido, a pulpotomia pode resultar em desvitalização, quando ocorre mumificação; preservação, quando há uma mínima desvitalização, sem formação de tecido reparador ou em regeneração do remanescente pulpar, que se dá quando há reparação e formação de tecido mineralizado. E, de acordo com Torres et al (2000) e Chibinski & Czlusniak (2003), dentro dos princípios biológicos, o ideal é a manutenção da vitalidade do remanescente pulpar radicular, com formação de barreira de tecido mineralizado na região onde a polpa foi amputada e a reorganização da camada de odontoblastos.

A atividade bactericida depende das condições relacionadas com o crescimento e a multiplicação bacteriana, entre os quais estão os fatores físico-químicos, tais como: temperatura, pH, pressão osmótica, as concentrações de oxigênio, dióxido de carbono e substrato. E são estes os fatores que estabelecem um dos quesitos de escolha da medicação intracanal, além da inocuidade e do favorecimento à reparação tecidual. De

um modo geral, os antibióticos promovem dois tipos de efeitos sobre a bactéria, inibem o crescimento ou a reprodução, ou conduzem à morte. Estes efeitos são exercidos essencialmente por interferir na síntese da parede celular, alterar a permeabilidade da membrana citoplasmática, interferir na síntese proteica ou na replicação cromossômica. A variação do pH reflete no crescimento bacteriano, uma vez que influencia a atividade enzimática e, em condições de elevado pH, a atividade enzimática das bactérias é inibida (ESTRELA & PÉCORA, 1997; MODENA et al, 2009).

Estrela & Pécora (1997) e Estrela & Holland (2003) afirmaram que o HC apresenta-se como um pó branco, alcalino (pH 12,8), pouco solúvel em água (solubilidade de 1,2 g/L de água, à temperatura de 25°C). É uma base forte, obtida a partir da calcinação (aquecimento) do carbonato de cálcio até sua transformação em óxido de cálcio (cal viva) e é obtido com a hidratação do óxido de cálcio e a reação entre este e o gás carbônico leva à formação do carbonato de cálcio.

Pesquisas que analisaram o HC, mostraram presença de granulações de calcita em tecido conjuntivo subcutâneo, polpa dental e tecidos periapicais. Essas granulações formam-se através da reação do cálcio do HC com o gás carbônico do tecido. Notou-se o acúmulo de fibronectina em íntimo contato com esses cristais de calcita, em meio de cultura sem células. Quando colocavam células da polpa em contato com esse ambiente, havia neoformação de células com aspecto morfológico de odontoblastos. Na ausência das granulações de calcita, havia apenas proliferação de fibroblastos. Fatos estes constituíram forte evidência do papel das granulações de calcita e da fibronectina como um ponto de partida inicial na formação de uma barreira de tecido duro (HOLLAND et al, 2002).

As propriedades biológicas e antimicrobianas do HC derivam de sua dissociação iônica em íons cálcio e íons hidroxila e da ação destes íons sobre os tecidos e as bactérias. A capacidade de o HC estimular a reparação de tecidos através da indução de mineralização confirma sua ação biológica (HOLLAND, 1971; ESTRELA & HOLLAND, 2003).

A ação antibacteriana do HC ou o mecanismo de ação de íons hidroxila sobre bactérias anaeróbicas é considerado excepcional devido ao seu elevado pH, com valores atingindo 12,6 e ocorre em decorrência da grande liberação de íons hidroxila. Estes íons são capazes de alterar a integridade da membrana citoplasmática bacteriana responsável por funções essenciais, como o metabolismo, crescimento e divisão celular, além de

participar dos últimos estágios da formação da parede celular, biossíntese de lipídios e transporte de elétrons, como enzimas envolvidas no processo de fosforilação oxidativa (WITHERSPOON et al, 2006; MODENA et al, 2009).

Os autores acreditam que os íons hidroxila do HC desenvolvem seu mecanismo de ação na membrana citoplasmática bacteriana alterando sua integridade. A alteração da integridade da membrana citoplasmática se dá através de injúrias químicas aos componentes orgânicos da mesma, interferindo no transporte de nutrientes ou por meio da destruição de fosfolipídios ou ácidos graxos insaturados da membrana. Este processo é denominado de peroxidação lipídica, sendo este na realidade, uma reação de saponificação (ESTRELA et al, 1995).

O HC pode interferir na produção bacteriana através da inativação enzimática de forma tanto reversível quanto irreversível. A inativação irreversível pode ser observada em condições extremas de pH durante um longo período de tempo no qual há uma total perda de atividade biológica da membrana citoplasmática. Na inativação reversível, se o pH retorna ao seu valor ideal para a ação enzimática, há um regresso da atividade biológica perdida e também se pode considerar que uma reativação da atividade catalítica é possível quando a enzima sair operando em um pH ideal (ESTRELA & HOLLAND, 2003).

O contato direto do HC com o tecido conjuntivo pulpar inicialmente dá origem a uma zona de necrose superficial atribuída ao alto pH do sal, alterando o estado físico-químico da substância intercelular que, por meio da ruptura de glicoproteínas, parece determinar a sua desnaturação proteica (Holland, 1971). Posteriormente, há evolução com proliferação fibroblástica, tendendo a isolar a área da exposição (GIRO et al, 1994). E a formação de tecido mineralizado, após o contato do HC com o tecido conjuntivo, foi observada do 7º ao 10º dia de contato (ESTRELA et al, 1995).

O HC ainda tem a capacidade de ativação de enzimas do tecido pulpar que favorece o restabelecimento deste tecido através da mineralização, observada por sua ação sobre a fosfatase alcalina em decorrência de seu elevado pH que estabelece a alta liberação de íons hidroxila (ESTRELA et al, 1995; ESTRELA & HOLLAND, 2003; WITHERSPOON et al, 2006; MODENA et al, 2009).

O valor de pH ótimo para a ativação da fosfatase alcalina varia de 8,6 a 10,3. (ESTRELA & HOLLAND, 2003). O pH elevado do HC ativa a fosfatase alcalina, que é uma enzima hidrolítica, que atua por meio de liberação do fosfato inorgânico a partir de

ésteres de fosfato, intimamente relacionados ao processo de mineralização. Esta enzima pode separar os ésteres fosfóricos, liberando íons de fosfato que, uma vez livres, reagem com íons de cálcio da corrente sanguínea para formar um precipitado, fosfato de cálcio, na matriz biológica. Este precipitado é a unidade molecular da hidroxiapatita (ESTRELA et al, 1995; ESTRELA & HOLLAND, 2003; WITHERSPOON et al, 2006).

A dentina é considerada a melhor proteção pulpar e HC, após numerosos estudos, é comprovadamente capaz de induzir a formação de barreira dentinária mineralizada sobre o tecido pulpar exposto. Para que isto ocorra, faz-se necessário um determinado tempo para que a pasta de HC manifeste seu potencial de ação sobre os microorganismos presentes, através da manutenção de uma elevada concentração de íons hidroxila que altera a atividade enzimática bacteriana e promove sua inativação. O HC age sobre as enzimas presentes na membrana citoplasmática, tanto das bactérias anaeróbicas quanto aeróbicas, quanto das gram positivas quanto negativas. Deste modo, os resultados das pesquisas conduziram a respostas sobre suas propriedades como histocompatibilidade, potencial antimicrobiano e aspectos físico-químicos que lhe dão credibilidade como material de escolha em diversas situações clínicas (ESTRELA & HOLLAND, 2003).

Segundo Witherspoon et al (2006), a dentina formada em resposta à estimulação pelo HC é geralmente mais porosa que a dentina normal e o tipo de dentina formada depende de uma série de variáveis que incluem o tipo de veículo utilizado, o grau de contato entre o HC e a polpa e a resistência do material selador à infiltração bacteriana.

Holland (1971) e Estrela & Holland (2003), enquanto estudaram morfológica e histoquimicamente o processo de reparação de polpa dentária de cães, após pulpotomia e proteção com HC, verificaram na zona granulosa superficial, interposta entre a zona de necrose e a zona granulosa profunda, a existência de granulação maciça. Estas estruturas são constituídas por sais de cálcio e complexos de proteínas. Abaixo da zona de granulação profunda, encontraram a zona de proliferação celular e a de tecido pulpar normal.

Observa-se que os íons hidroxila e os íons de cálcio do HC agem de forma sinérgica na mineralização. Enquanto os íons hidroxila ativam a fosfatase alcalina, privilegiando a mineralização, os íons de cálcio permitem a redução da permeabilidade dos novos capilares no tecido granulado de dentes pulpotomizados, diminuindo a quantidade de líquido intercelular e ativando a aceleração da perofosfatase em alta

concentração e este é um fator importante durante a mineralização. Eles interagem no complemento da atividade do sistema de reação imunológica (ESTRELA et al, 1995; ESTRELA & HOLLAND, 2003).

Mediante análise química de pastas de hidróxido de cálcio, frente à liberação de íons cálcio, de íons hidroxila e na presença de tecido conjuntivo de cães, os resultados os estudos de Estrela & Pesce (1996) reportam que o veículo acrescido ao HC pró-análise para a confecção da pasta influencia na velocidade de dissociação iônica, nas propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, na ação antimicrobiana e mineralizadora. Reportam ainda que a velocidade de dissociação iônica também é influenciada pela diferença de viscosidade dos veículos empregados, sua hidrossolubilidade ou não, característica ácido-base, pela proporção pó-líquido das pastas, permeabilidade dentinária e grau de calcificação presente.

Os veículos que vêm sendo utilizados nas pastas de HC influenciam na velocidade de dissociação iônica favorecendo sua penetrabilidade e/ou interagindo, potencializando seu reconhecido poder antimicrobiano. Entre as características químicas, os veículos apresentam-se como hidrossolúveis (aquosos - soro fisiológico, água destilada, solução anestésica; e viscosos - polietilenoglicol, propilenoglicol, metil celulose) e não hidrossolúveis (oleosos - paramonoclorofenol canforado, óleo de oliva, lipiodol). Dentre os veículos estudados encontram-se diferentes substâncias como a água destilada, solução salina, propilenoglicol, paramonoclorofenol canforado, clorexidina, glicerina, iodoformio, sulfato de bário, corticosteróide-antibiótico, antibióticos, solução anestésica, metilcelulose e detergentes. A multiplicidade de veículos empregados nas pastas de HC demonstra a ausência de consenso entre a substância que deve ser eleita para associar-se ao HC pró-análise (ESTRELA & PÉCOR, 1997).

Após inúmeras pesquisas sobre os veículos empregados nas pastas de HC, Estrela e Pécora (1997) concluíram que, a maior liberação de íons hidroxila, a maior facilidade de eliminação de microrganismos e os maiores índices de reparação são decorrentes da maior velocidade de dissociação e difusão iônica quando do uso de veículos hidrossolúveis.

Holland et al (1981) estudaram o processo de cura da polpa de cães após pulpotomia seguida de proteção pulpar, utilizando-se pasta de HC ou pó. Após 30 dias, os resultados histológicos foram de que não houve diferenças estatísticas entre os grupos experimentais e que quase 90% das amostras apresentaram ponte de tecido

completamente mineralizado, mantendo a vitalidade pulpar e protegendo-a de inflamação.

Albuquerque et al (2006) realizaram uma pesquisa com o objetivo de avaliar o aspecto histológico do complexo dentino-pulpar em dentes de cães quando capeado após a pulpotomia com etil-cianoacrilato (ECCL) e HC. Após 30 dias, foi observada formação de barreira mineralizada em 83,3% dos dentes tratados com ECCL e em 100% daqueles tratados com HC. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0.478$). A barreira de tecido duro contínua foi observada em 50% dos casos tratados com ECCL e em 75% dos com HC ($p=0,652$). Pode-se concluir que ambos os materiais induziram à formação da barreira de tecido duro. Além disso, a diferença observada entre as estruturas das barreiras (contínuas e não-contínuas) não foi significativa e que a necrose pulpar não foi observada nos grupos.

Moretti et al (2008) avaliaram, através de observações clínicas e radiográficas, a resposta pulpar de dentes decíduos humanos submetidos à pulpotomia, utilizando-se três materiais capeadores: 1- Formocresol diluído a 1/5 (FC); 2- HC pró-análise; 3- MTA. As pulpotomias foram realizadas e os dentes restaurados com cimento de ionômero de vidro modificados por resina (Vitremér®). As avaliações pós-operatórias ocorreram nos períodos de 3, 6 e 12 meses e apresentaram os seguintes resultados: após seis meses, a formação de barreira dentinária ocorreu nos grupos MTA e HC. Foi observada radiograficamente a presença de barreira dentinária nos dois grupos MTA e HC, mas não em FC. Além disso, o HC levou a quadros de reabsorção interna em 42,9% da amostra em seis meses. Concluiu-se que o MTA obteve um resultado satisfatório, demonstrando ser uma opção, dentre os materiais biológicos, no tratamento pulpar de dentes decíduos e o HC mostrou resultados controversos, oscilando entre resultados positivos e negativos, reafirmando os relatos da literatura sobre a importância de um diagnóstico criterioso da capacidade de resposta pulpar diante de enfermidades.

Para Baldissera (2006), o controle do sangramento frente a uma exposição pulpar é de fundamental importância no sucesso do capeamento direto. As soluções de hipoclorito de sódio e de gluconato de clorexidina têm sido utilizadas como agentes de limpeza e hemostasia na terapia pulpar conservadora.

Defensores da utilização do HC no controle da hemorragia pulpar sugerem que a reabsorção interna pode ser prevenida com o contato direto do HC com o tecido pulpar. Entretanto, isso pode ser tecnicamente difícil de ser alcançado, já que uma incisão em

tecido vital pulpar produz hemorragia e exsudação. Deste modo, é difícil se conseguir um ambiente totalmente seco, como é o caso da câmara pulpar no momento da pulpotomia ou do capeamento direto (MORETTI et al, 2008).

Outro fator de fundamental importância para o sucesso do tratamento conservador da polpa é a ausência de contaminação nos tecidos expostos durante os procedimentos operatórios. A presença maciça de microrganismos patogênicos nos tecidos dentais poderia determinar uma reação inflamatória extrema do tecido conjuntivo pulpar, dificultando a instalação dos fenômenos reparativos que conduziriam a formação da barreira mineralizada. Além disso, a ação local de produtos bacterianos, em adição à destruição tissular promovida por uma reação tecidual de defesa exacerbada, também poderia determinar a indução de quadros de necrose, inviabilizando a recuperação dental (MONDELLI, 1998; TORRES et al, 2000).

O processo reparativo pulpar é um fenômeno biológico bastante complexo, que inclui a proliferação das células pulpares sob a superfície ferida, migração e elaboração de novo colágeno em contato com a zona de polpa traumatizada; calcificação distrófica da área de necrose e mineralização do colágeno neodepositado em osteodentina (fibrodentina); e diferenciação de uma nova geração de células formadoras de matriz dentinária (odontoblastos). Os odontoblastos originam-se a partir da diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas do parênquima pulpar (TORRES et al, 2000).

Inúmeros materiais, além do HC pró-análise, foram testados experimentalmente em tratamentos conservadores da polpa dental. Dentre eles, formulações à base de HC, hidróxido de magnésio, cloreto de cálcio, carbonato de cálcio, fosfato tricálcico, hidróxido de amônia, fosfato alcalino, penicilina potássica, ácido fosfórico a 37%, “primers”, proteínas osteogênicas ou morfogênicas, entre outros. Todos eles com o intuito de produzir ponte de dentina sobre exposições pulpares, mas esses materiais mostraram resultados menos satisfatórios quando comparados ao HC puro, tanto clínica como microscopicamente e alguns apresentaram efeito citotóxico em culturas de células, mesmo após sua difusão pela dentina (MONDELLI, 1998). Estudos sobre os agentes adesivos relatam que esse material, quando alcança o espaço pulpar, desencadeia uma reação inflamatória crônica, do tipo corpo estranho (HEBLING et al, 1999), a qual pode resultar em reabsorção dentinária interna (COSTA et al, 2002). O MTA também foi indicado no tratamento da polpa como material para capeamento pulpar direto (TORABINEJAD et al, 1995; PITT FORD et al, 1996).

Quando o HC foi aplicado sobre polpas, notadamente se estiverem inflamadas, pode ocorrer defeitos em forma de túnel ou mesmo pontes de tecido duro parciais. Holland et al, (1999) realizaram um trabalho experimental em dentes de macacos, tendo demonstrado que a troca do HC, 30 dias após a proteção direta da polpa, em casos de pulpotomia, levava à correção de defeitos em forma de túnel e a complementação de pontes parciais. Esses resultados acabaram por motivar a definição de uma técnica de tratamento em dois tempos para dentes humanos.

Nakata et al (1998) ressaltaram que o material ideal para proteção pulpar direta deve ser biocompatível, radiopaco, desenvolver atividade antibacteriana, apresentar propriedade hidrofílica com composição similar à dentina, ser capaz de promover um selamento adequado, induzir osteogênese e cementogênese, não carcinogênico, não tóxico, não promover resposta imunológica e não causar inconveniência para o paciente ou para o profissional. E para este fim, Costa et al (2000) afirmam que pesquisas sobre novas técnicas de capeamento pulpar que promovam a cicatrização tecidual por meio da completa formação de ponte dentinária e com menor efeito citotóxico continuam sendo desenvolvidas.

Deste modo, embora os tratamentos com o HC sejam bem sucedidos, na última década outros materiais surgiram e estão sendo testados como protetores da polpa, *in vivo* e *in-vitro*, tais como o uso de sistemas adesivos, MTA e de biomateriais encontrados na natureza entre eles cerâmicas bioativas como a hidroxiapatita, proteínas morfogenéticas e o extrato de própolis (QUEIROZ et al, 2005).

3 - METODOLOGIA:

3.1 - Obtenção do Preparado de Otólitos:

Cerca de 100g de otólitos de *Cynoscion acoupa* foram triturados em almofarizes até se obter um pó de granulação fina e coloração esbranquiçada (Anexo V). O composto final foi diluído em 0,25 g gelatina incolor, acondicionado em placas de petri, esterilizado em ultravioleta (Anexo VII) por 25 minutos e acondicionado em caixa metálica estéril, sob chama.

3.1.1 – Medida do pH dos otólitos:

O método mais utilizado para a medida do pH é o potenciométrico, através de um instrumento chamado pH-metro. O pH-metro é constituído por dois eletrodos conjugados: um indicador e outro de referência. O eletrodo de referência possui um potencial constante e o indicador é aquele que adquire o pH da amostra em comparação com a referência. Para mensurar o pH, fez-se necessário a calibração do aparelho phmetro Digimed® (São Paulo, SP, Brasil). Em seguida, iniciou-se a medida do pH da amostra de otólito e, para tanto, foi diluído em um béquer 1,0 g de otólito em 100 mL de água destilada e efetuou-se a medição seguindo as instruções de operação do aparelho descritas pelo fabricante. A expressão do resultado foi lida diretamente no aparelho e correspondeu a um pH de 8,7 (Anexos V e VI).

3.2 - Experimentação em animais:

Para que o presente estudo fosse levado a cabo, já que envolveu pesquisa em animais experimentais, o projeto foi submetido e aprovado pelos Comitês de Ética da Universidade Tiradentes, sob o número do protocolo CEP/UNIT: 030509 (Anexo I) e da Faculdade Pio Décimo, memorando número 02/09, de 18 de agosto de 2009 (Anexo II).

Para a cessão dos dois cães, procedentes do Centro de Zoonozes de Aracaju, fez-se necessária a apresentação do projeto de pesquisa e uma solicitação ao Secretário Municipal de Saúde (Anexo III). Tendo em vista as despesas provenientes de todos os procedimentos clínicos, laboratoriais, cirúrgicos, medicamentosos, de alimentação, higiene e manutenção da saúde dos animais firmou-se com a direção da Faculdade Pio Décimo uma parceria para a realização da pesquisa (Anexo IV).

Os animais foram selecionados levando-se em conta as melhores condições de saúde geral e bucal e a docilidade, no intuito de facilitar o trato com os mesmos.

Foram utilizados dois cães aparentemente hígidos, sem raça definida, machos, adultos com idade de um a três anos, com peso entre 10 (cão I – 30 dias) e 13 kg (cão II – 21 dias), procedentes do Centro de Controle de Zoonozes de Aracaju, os quais, durante toda a pesquisa experimental, foram mantidos em canis individuais no Hospital Veterinário da Faculdade Pio Décimo, sob os cuidados de um veterinário. Os cães foram submetidos a exame clínico completo, passaram por um período de quarentena no qual foram vermifugados, desparasitados, vacinados com vacina anti-rábica e polivalente, fizeram uso de coleira repelente tipo escalibur, foram submetidos à dosagem de uréia e creatinina, função hepática, urinálise, hemograma, exame de fezes, leishmaniose e a tratamento de pele.

Um cão adulto com a dentição considerada completa tem 42 dentes, divididos em 20 e 22 dentes nas arcadas superior e inferior respectivamente (Anexo IX), sendo:

a) 12 incisivos, 6 superiores e 6 inferiores - situados entre os caninos e em forma de cunha, com a função de cortar;

b) 4 caninos, 2 superiores e 2 inferiores - têm forma cônica e são longos e ligeiramente recurvados, e sua função é predatória, localizando-se entre os incisivos e os pré-molares;

c) 16 pré-molares, 8 superiores e 8 inferiores - têm forma piramidal achatada, os situados mais à frente ajudam na apreensão e os mais atrás na mastigação;

d) 10 molares, 4 superiores e 6 inferiores - os primeiros molares inferiores têm formato parecido com os pré-molares enquanto os outros possuem face trituradora, têm função mastigatória;

e) Os maiores dentes das arcadas são o quarto pré-molar superior e o primeiro molar inferior - têm a função de dilacerar e são conhecidos como carneiros.

							<table><tr><td>Palmer</td><td>13</td><td>12</td><td>11</td><td>10</td><td>9</td><td>8</td></tr><tr><td>Triadan</td><td>103</td><td>102</td><td>101</td><td>201</td><td>202</td><td>203</td></tr><tr><td>Anatômico</td><td>P</td><td>P</td><td>P</td><td>P</td><td>P</td><td>P</td></tr><tr><td>Universal</td><td>13</td><td>12</td><td>11</td><td>10</td><td>9</td><td>8</td></tr><tr><td>Haderup</td><td>3+</td><td>2+</td><td>1+</td><td>+1</td><td>+2</td><td>+3</td></tr><tr><td>Zsigmondy</td><td>3</td><td>2</td><td>1</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td></tr><tr><td>Fed. internacional</td><td>1.3</td><td>1.2</td><td>1.1</td><td>2.1</td><td>2.2</td><td>2.3</td></tr></table>							Palmer	13	12	11	10	9	8	Triadan	103	102	101	201	202	203	Anatômico	P	P	P	P	P	P	Universal	13	12	11	10	9	8	Haderup	3+	2+	1+	+1	+2	+3	Zsigmondy	3	2	1	1	2	3	Fed. internacional	1.3	1.2	1.1	2.1	2.2	2.3							
Palmer	13	12	11	10	9	8																																																															
Triadan	103	102	101	201	202	203																																																															
Anatômico	P	P	P	P	P	P																																																															
Universal	13	12	11	10	9	8																																																															
Haderup	3+	2+	1+	+1	+2	+3																																																															
Zsigmondy	3	2	1	1	2	3																																																															
Fed. internacional	1.3	1.2	1.1	2.1	2.2	2.3																																																															
Palmer	Triadan	Anatômico	Universal	Haderup	Zsigmondy	Fed. internacional							Fed. internacional	Zsigmondy	Haderup	Universal	Anatômico	Triadan	Palmer																																																		
C1	104	C1	14	4+	4	1.4					2.4	4	4+	7	C1	204	C1																																																				
P1	105	P1	15	5+	5	1.5					2.5	5	5+	6	P1	205	P1																																																				
P2	106	P2	16	6+	6	1.6					2.6	6	6+	5	P2	206	P2																																																				
P3	107	P3	17	7+	7	1.7					2.7	7	7+	4	P3	207	P3																																																				
P4	108	P4	18	8+	8	1.8					2.8	8	8+	3	P4	208	P4																																																				
M1	109	M1	19	9+	9	1.9					2.9	9	9+	2	M1	209	M1																																																				
M2	110	M2	20	10+	10	1.10					2.10	10	10+	1	M2	210	M2																																																				
M2	410	M2	41	10-	10	4.10	Direita	Esquerda			3.10	10	10-	22	M2	310	M2																																																				
M1	409	M1	40	9-	9	4.9					3.9	9	9-	23	M1	309	M1																																																				
P4	405	P4	39	6-	6	4.6					3.6	6	6-	24	P4	306	P4																																																				
P3	407	P3	38	7-	7	4.7					3.7	7	7-	24	P3	307	P3																																																				
P2	406	P2	37	6-	6	4.6					3.6	6	6-	25	P2	306	P2																																																				
P1	405	P1	36	5-	5	4.5					3.5	5	5-	26	P1	305	P1																																																				
C1	404	C1	35	4-	4	4.4					3.4	4	4-	27	C1	304	C1																																																				
							<table><tr><td>Fed. internacional</td><td>4.3</td><td>4.2</td><td>4.1</td><td>3.1</td><td>3.2</td><td>3.3</td></tr><tr><td>Zsigmondy</td><td>3</td><td>2</td><td>1</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td></tr><tr><td>Haderup</td><td>3-</td><td>2-</td><td>1-</td><td>-1</td><td>-2</td><td>-3</td></tr><tr><td>Universal</td><td>34</td><td>33</td><td>32</td><td>31</td><td>30</td><td>29</td></tr><tr><td>Anatômico</td><td>I3</td><td>I2</td><td>I1</td><td>P1</td><td>P2</td><td>P3</td></tr><tr><td>Triadan</td><td>402</td><td>402</td><td>401</td><td>301</td><td>302</td><td>303</td></tr><tr><td>Palmer</td><td>I3</td><td>I2</td><td>I1</td><td>P1</td><td>P2</td><td>P3</td></tr></table>						Fed. internacional	4.3	4.2	4.1	3.1	3.2	3.3	Zsigmondy	3	2	1	1	2	3	Haderup	3-	2-	1-	-1	-2	-3	Universal	34	33	32	31	30	29	Anatômico	I3	I2	I1	P1	P2	P3	Triadan	402	402	401	301	302	303	Palmer	I3	I2	I1	P1	P2	P3								
Fed. internacional	4.3	4.2	4.1	3.1	3.2	3.3																																																															
Zsigmondy	3	2	1	1	2	3																																																															
Haderup	3-	2-	1-	-1	-2	-3																																																															
Universal	34	33	32	31	30	29																																																															
Anatômico	I3	I2	I1	P1	P2	P3																																																															
Triadan	402	402	401	301	302	303																																																															
Palmer	I3	I2	I1	P1	P2	P3																																																															

Figura 1: Organograma de Holmstrom com os sistemas de nomenclatura dental para cães. Fonte: ROZA, 2004.

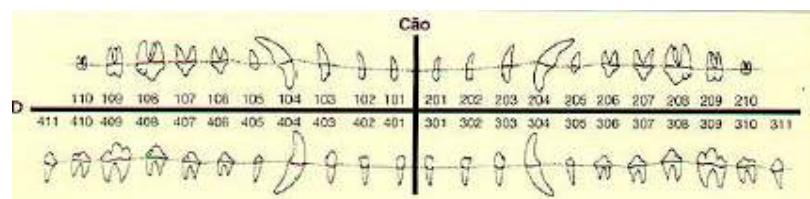


Figura 2: Odontograma demonstrativo de quadrante da arcada dentária de cães com nomenclatura dental de Triadan: Fonte: ROZA, 2004.

Os cães foram submetidos a jejum alimentar prévio de 12 horas e hídrico de 4 horas antes dos procedimentos anestésicos. Os animais, após exame clínico, foram pesados. Receberam medicação pré-anestésica (MPA) com acepromazina (Acepran®, Univet Indústria Veterinária S.A., Campo Grande, MS, Brasil), na dose de 0,1 mg/Kg associado ao tramadol (Ultracet®, JANSSEN-CILAG Farmacêutica Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil), na dose de 2,0 mg/Kg. A indução anestésica foi realizada com propofol (Diprivan®, Astra Zeneca do Brasil Ltda., Cotia, SP, Brasil), na dose de 5,0 mg/kg por via intravenosa e anestesia regional para bloqueio dos nervos infra-orbitário e mentoniano com cloridrato de lidocaína a 2%, sem vasoconstrictor (Xylestesin®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil), na dose de 1,0 mL para cada forame (infra-orbitário e mentoniano, respectivamente). Os animais foram intubados e mantidos com isoflurano® (Instituto BioChimico Indústria Farmacêutica Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) diluído em oxigênio a 100% e as frequências cardíacas aferidas antes da administração dos fármacos (tempo zero) e a cada 10 minutos após o início do ato anestésico.

Os incisivos superiores e inferiores foram utilizados no experimento, perfazendo um total de 24 dentes. Os espécimes foram identificadas de 1 a 12 para cada animal.

Foram preparadas cavidades, tipo classe V, com auxílio de ponta diamantada em alta rotação, as quais foram aprofundadas até que, por transparência, a coloração rosa-avermelhada da polpa fosse visualizada, sob abundante refrigeração a spray com soro fisiológico. O controle da hemorragia e a secagem da exposição pulpar foram executados com algodão autoclavado embebido em soro fisiológico. Uma vez que todas as variáveis deveriam ser testadas no mesmo animal, o mínimo de três dentes, escolhidos aleatoriamente, foram utilizados como uma alternativa para os protocolos experimentais. Pela dificuldade técnica para extração de dentes como molares, pré-molares e caninos, optou-se por utilizar na pesquisa apenas os incisivos superiores e inferiores de ambos os arcos. Em cada animal que compôs a amostra, constituíram-se três grupos.

A proteção pulpar direta dos dentes foi realizada da seguinte maneira: nos espécimes 1, 2 e 3, foi realizada a proteção pulpar direta com a pasta de hidróxido de cálcio (grupo HC), destarte funcionando como controle positivo; nos espécimes 4, 5, 6, 7, 8 e 9 a proteção pulpar direta foi realizada com pasta de otólitos (grupo OTL); nos espécimes 10, 11 e 12, não foi realizado nenhum procedimento de proteção pulpar direta, representando este grupo o controle negativo (grupo CTR). As extrações dentárias foram realizadas 21 e 30 dias após os procedimentos de dentisteria.

Nos grupos HC, com o total de 6 dentes, com o auxílio de uma seringa centrix® (Copyright © DFL Indústria e Comércio S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brasil), a pasta de hidróxido de cálcio PA® (Asfer Indústria Química Ltda., São Caetano do Sul, SP, Brasil), manipulada dispensando-se 1 porção do pó em 1 gota de água destilada sobre placa de vidro estéril, foi depositada sobre o remanescente pulpar, numa espessura de aproximadamente 1mm, de modo a cobrir toda a exposição pulpar, porém sem excesso de material.

Nos Grupos OTL, com o total de 12 dentes, foi preparado o otólito manipulando por aglutinação com espátula, em placa de vidro estéril, dispensando-se 1 porção da pasta diluída em 1 gota de água destilada. A mistura foi espatulada durante 30 segundos, inserida sobre a exposição pulpar com auxílio de uma seringa centrix.

Após a proteção pulpar, foi realizada a restauração definitiva das cavidades com cimento de ionômero de vidro quimicamente ativado, com o auxílio de seringa centrix e de acordo com especificação do fabricante (Bioglass R®, Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda., Ibioporã, PR, Brasil).

Os critérios pré-estabelecidos de exclusão dos dentes a serem utilizados no experimento, após os procedimentos de exposição e proteção pulpar, foram: mobilidade, presença de fístula ou abscesso, previamente fraturados e com impossibilidade restauradora.

Decorridos os períodos de 21 e 30 dias após a realização dos preparos cavitários e a proteção pulpar, em nenhum dos animais houve dentes com perda de restauração de modo que pudessem alterar os resultados da pesquisa. Todos os dentes foram considerados sucesso clínico já que não apresentaram sinais clínicos de mobilidade, de abscesso e/ou fístula.

Deve ser ressaltado que, após os períodos experimentais, os dentes foram extraídos sem eutanásia dos animais, que foram submetidos à adoção.

3.3 – Procedimentos de experimentação animal:

3.3.1 - Procedimentos de dentisteria

Após profilaxia com bicarbonato de sódio (Anexo X), limpeza de tártaro e alisamento manual, o isolamento absoluto do campo operatório com dique de borracha (Anexo XI) e a desinfecção do campo operatório com gluconato de clorexidina a 2%, realizou-se a exposição padronizada da polpa dos incisivos superiores e inferiores hígidos, cujo tamanho da perfuração correspondeu ao diâmetro da broca diamantada nº 1012 (Vortex ® Indústria e Comércio de Ferramentas Diamantadas Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e a profundidade dependeu da quantidade de esmalte e dentina de cada dente, com alta rotação, sob irrigação copiosa com soro fisiológico e movimentos intermitentes para evitar a geração de calor durante o preparo da cavidade. O estado de saúde pulpar foi avaliado clinicamente após a exposição pulpar através de avaliação visual (cor vermelho vivo), tátil (textura) e sangramento espontâneo (Anexo XII)

O tecido pulpar remanescente foi irrigado abundantemente com soro fisiológico para controle da hemorragia e remoção de detritos, evitando-se pressão sobre polpa, e, para impedir a formação de coágulo, o sangramento foi contido com bolinha de algodão autoclavado embebida em solução fisiológica. A proteção pulpar e o selamento das cavidades foram efetuados conforme descritos anteriormente. Após a proteção pulpar com os materiais testados, removeu-se o excesso das pastas das paredes laterais das cavidades antes do selamento. O esmalte e a dentina não foram condicionados com ácido para realização das restaurações (selamento) (Anexos XII, XIII, XIV e XV).

Após os procedimentos operatórios de exposição e proteção pulpar e selamento das cavidades dentárias, os animais foram mantidos em cativeiros individualizados até o momento das extrações (21 e 30 dias), com alimentação pastosa durante as primeiras 24 horas após o experimento e posterior alimentação com ração Clubber, acondicionada em sacos de 25 Kg e composta basicamente de farinha de carne de aves desidratada, arroz quebrado, proteína isolada de suíno, gordura animal estabilizada, gordura de frango, milho integral moído, farinha de trigo, óleo de peixe refinado, óleo vegetal, polpa de beterraba, mannan-oligossacarídeos, ovo desidratado, levedura seca de cervejaria, colina, hidrolisado de fígado de frango, antioxidante, premix vitamínico mineral, epremix micromineral transquelatado. Água a vontade. Durante todo o período, os cães foram monitorados constantemente por um médico veterinário para verificação do estado geral de saúde e receberam medicação pós-operatória com meloxicam, na dose de 0,1 mg/Kg a cada 24 horas e tramadol, na dose de 2,0 mg/Kg de 8/8 horas, ambas por 7 dias.

3.3.2 - Procedimentos de extração dentária

Após 21 e 30 dias, os animais foram pesados, pré-anestesiados e receberam indução anestésica de acordo com o protocolo anestésico anteriormente descrito e, em seguida, os incisivos foram extraídos (Anexos XVI e XVII).

Após extração, foi realizada uma secção na porção mais apical das raízes a fim de facilitar a penetração do agente fixador. Em seguida, os dentes foram acondicionados em frascos previamente identificados, contendo solução de formol tamponado (pH 7,4) a 10% por um período mínimo de 48 horas.

Depois de concluída toda parte experimental, os cães ainda foram mantidos em cativeiros individualizados por 7 dias, com alimentação pastosa nas primeiras 24 horas, ração e água à vontade nos demais. Durante todo o período, os cães foram acompanhados por um médico veterinário para verificação do estado geral de saúde e receberam medicação pós-operatória na mesma posologia descrita no item 3.3.1. Decorrido o pós-operatório, os animais foram adotados.

3.4 - Procedimentos de análise imaginológica.

3.4.1 - Análise radiográfica

Utilizando os mesmos procedimentos técnicos descritos a seguir, fez-se uma tomada radiográfica do preparado de otólitos a fim de confirmar sua radiopacidade.

Todas as radiografias foram tomadas por um único radiologista, empregando um aparelho Dabi Atlante[®] (Brasil), ajustado com tensão nominal para 60 kVp (volts de potência) e corrente no tubo de 6,5mA (miliampere), com distância foco-filme de 20 cm e tempo de exposição de 0,5 segundos. Para as tomadas radiográficas usou-se posicionador Rinn[®] (Rinn Corporations, Elgin, Illinois – USA), os dentes foram fixados com fita adesiva ao filme com a finalidade de seguir igual projeção e distância foco/filme para todas as radiografias. Utilizaram-se películas radiográficas periapicais Ultra-speed D (kodak[®]). O processamento radiográfico foi padronizado usando o método tempo-temperatura. Os filmes foram revelados em câmara escura, com revelador KODAK[®] GBX e fixador KODAK[®] GBX; as películas foram presas em colgaduras para filmes, sendo estas reveladas por 5 minutos, lavadas por 20 segundos em água corrente e fixadas por 10 minutos. Após o processamento, os filmes foram novamente lavados por 20 minutos

em água corrente. Com estes procedimentos todos concluídos, as radiografias foram colocadas para secar. Após o processamento, as radiografias foram acondicionadas em molduras para diapositivos. O conjunto radiografia/moldura foi armazenado em cartelas individuais para diapositivos (Anexo XXI).

Após tomada radiográfica, os espécimes foram analisados por dois radiologistas, em estudo cego, informados apenas de que se tratava de um experimento em cães, nos incisivos, com preparo cavitário de classe V nas faces vestibulares do dentes. A avaliação foi realizada considerando-se os critérios ausência (-) ou presença (+) de imagem radiográfica compatível com formação de barreira mineralizada. Após a avaliação individual, os dois examinadores realizaram sessão de concordância entre os laudos para que as possíveis divergências fossem dirimidas e o laudo final fosse emitido.

3.4.2 - Análise tomográfica

Com a finalidade de evidenciar as relações estruturais em profundidade, principalmente dos tecidos mineralizados, em camadas com definição e delimitação tridimensional, os dentes foram submetidos à tomografia computadorizada volumétrica de feixe cônico com tecnologia cone beam, com equipamento i-CAT da Imaging Sciences Internacional® (USA), no qual se utilizou o protocolo Mand 6,0 cm, 40 sec, 0,5 Voxel Max Res, ou seja, a máxima resolução através de um campo de visão (FOV) de 6,0 cm, duração de 40 segundos e voxel de 0,2 mm. Para tanto, confeccionaram-se duas arcadas em elastômero pesado, uma para cada animal, nas quais os dentes foram alojados (Anexo XVIII). Os arcos foram colocados lado a lado sobre um suporte e foi realizada uma única aquisição tomográfica. Em seguida, utilizando-se o software Xoran, foram feitas duas reconstruções panorâmicas, uma para cada arco (Anexo XIX), e um corte sargital mais central de cada dente, nas porções coronária e no terço cervical da polpa radicular, próximo ao local da exposição (Anexo XX). Em virtude da cobertura do arco, utilizaram-se as ferramentas de correção de posicionamento, disponibilizadas pelo programa. As imagens sargitais foram salvas em arquivos diferentes para preservar o posicionamento, sendo apresentadas em tamanho real (1:1) e aumentadas para facilitar a visualização.

3.5 - Análise morfológica dos espécimes:

Inicialmente, os espécimes fixados foram submetidos a protocolo de descalcificação durante 96 horas. Os espécimes foram acondicionados em vasos tipo Becker, imersos em uma solução de 1840 mL de água destilada, 160 mL de ácido clorídrico absoluto e 20 g de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético). Em seguida, os dentes foram banhados em água corrente por 2 horas para remoção do agente descalcificador.

Após período de descalcificação, os dentes foram hemisseccionados em seu longo eixo, avaliados macroscopicamente (Anexo XXII), totalmente incluídos em cassetes de plástico para, então, serem postos no processador automático (Leica TP 1020) durante 12 horas, seguindo a rotina padrão do laboratório (desidratação em soluções crescentes de álcool e diafanização em xilol) e submetidos ao processo de inclusão em parafina.

Secções histológicas do material embocado em parafina foram obtidas utilizando-se Micrótomo (Spencer “820”) regulado para secções de 5µm (micrômetros) de espessura que posteriormente foram processados para a coloração Hematoxilina/Eosina (HE) (Anexos XXIII e XXIV).

As secções histológicas coradas em HE foram analisadas sob duas óticas diferentes. Efetuou-se, portanto, uma análise descritiva da barreira mineralizada obedecendo aos seguintes critérios:

- *contínua* - quando havia formação de material mineralizado que se estendia de um lado a outro da parede dentinária, sem comunicação entre a zona de exposição e a polpa dental;
- *descontínua* - quando a formação de material mineralizado não ocupava toda a extensão da exposição ou havia hiatos na sua estrutura, permitindo a comunicação entre a zona de exposição e a polpa dental;
- *ausente* - quando não havia formação de material mineralizado.

A intensidade da reação inflamatória do tecido pulpar foi analisada por semiquantificação e categorizada de acordo com os seguintes critérios:

0 – infiltração inflamatória ausente.

1 – infiltração inflamatória leve, representando os leucócitos menos de 10% das células estromais observadas no tecido pulpar.

2 – infiltração inflamatória moderada, representando os leucócitos mais de 10 e menos de 50% das células estromais observadas no tecido pulpar.

3 – infiltração inflamatória intensa, representando os leucócitos mais de 50% das células estromais observadas no tecido pulpar.

Após a semiquantificação da intensidade da resposta inflamatória pulpar, o infiltrado foi classificado de acordo com o tipo leucocitário predominante em:

a) *Infiltrado inflamatório agudo* – quando se observou um predomínio de leucócitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN), com ou sem piócitos e áreas de necrose liquefativa tecidual.

b) *Infiltrado inflamatório crônico* - quando se observou um predomínio de células inflamatórias mononucleares constituídas por linfócitos, plasmócitos e macrófagos.

c) *Infiltrado inflamatório sub-agudo* – quando houver um equilíbrio entre a população leucocitária polimorfonuclear e mononuclear. .

3.6 – Procedimentos de análise dos dados

A acurácia das informações observadas na análise radiográfica e tomográfica quanto à presença ou ausência de barreira mineralizada foi comparada com os dados morfológicos por meio de estatística descritiva (medidas de frequência de acertos).

A frequência da presença e o tipo (contínua ou descontínua) de barreira mineralizada observados histologicamente foram comparados entre os grupos HC, OTL e CTR pelo teste não paramétrico exato de Fischer.

A análise semiquantitativa do infiltrado inflamatório pulpar foi comparado entre os grupos HC, OTL e CTR pelo teste não paramétrico Kruskal-wallis, com extensão post-hoc de Dunn.

As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de “p” foram menores que 0,05 ($p < 0,05$).

4 – RESULTADOS:

Foi observado que o pH da amostra de otólitos foi 8,7 (Anexo VI). Além disso, a tomada radiográfica deste material revelou que este era radiopaco (Anexo VIII).

Após a avaliação radiográfica (figura 3a/b/c), foi observada, em 21 dias, a presença de barreira mineralizada em 100% dos espécimes dos grupos experimentais HC(3) e OTL(n=6), mas não no CTR(n=3). Na análise tomográfica (figuras 4 e 6), a barreira foi visualizada em 1 espécime (33,3%) do grupo CTR e em 100% dos grupos HC(n=3) e OTL(n=6). Já em 30 dias, tanto radiográfica (figura 3d/e/f) quanto tomograficamente (figuras 5 e 6), observou-se a presença de barreira mineralizada em 100% do grupo HC(n=3) e 83,3% do grupo OTL(n=5). No entanto, foi observada imagem radiopaca consistente com formação de barreira em 66,6% do grupo CTR(n=2) quando da análise radiográfica, o que não foi constatado na tomografia *cone beam* (tabela 1).

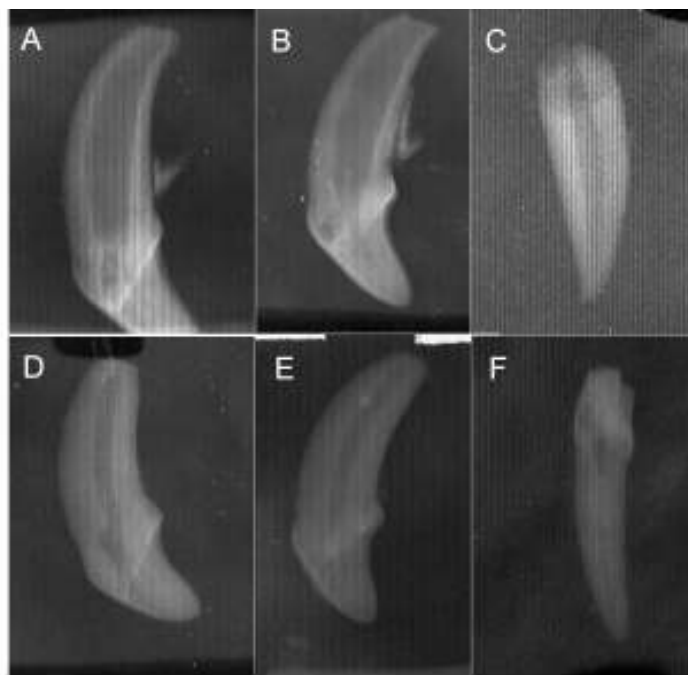


Figura 3. Visualização radiográfica da barreira mineralizada em HC (A e D) e OTL (B e E), após 21 e 30 dias, respectivamente. Observar ausência de barreira em CTR (C e F).

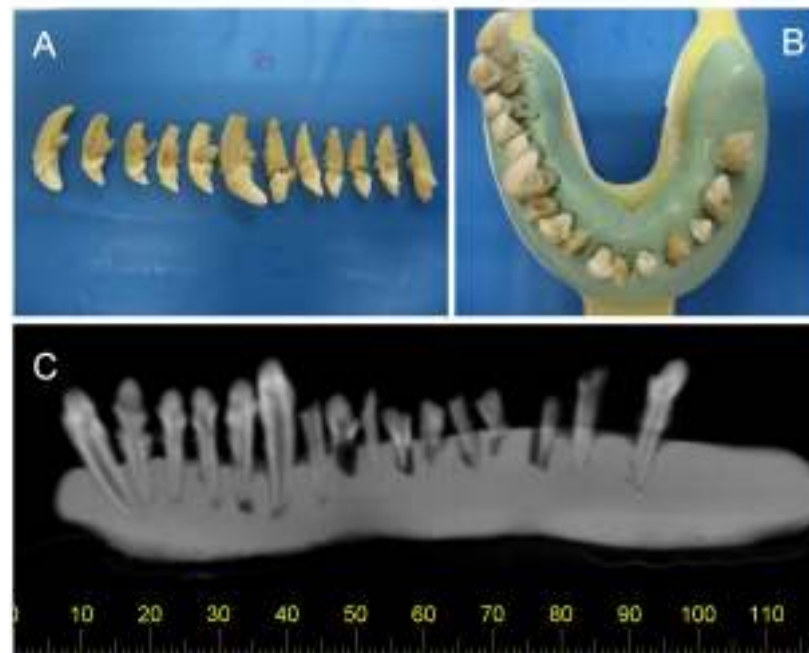


Figura 4. Dentes extraídos 21 dias após os procedimentos clínicos operatórios (A), devidamente montados para tomada tomográfica volumétrica de feixe cônico (*cone beam*) (B). Visão panorâmica da imagem tomográfica (C).

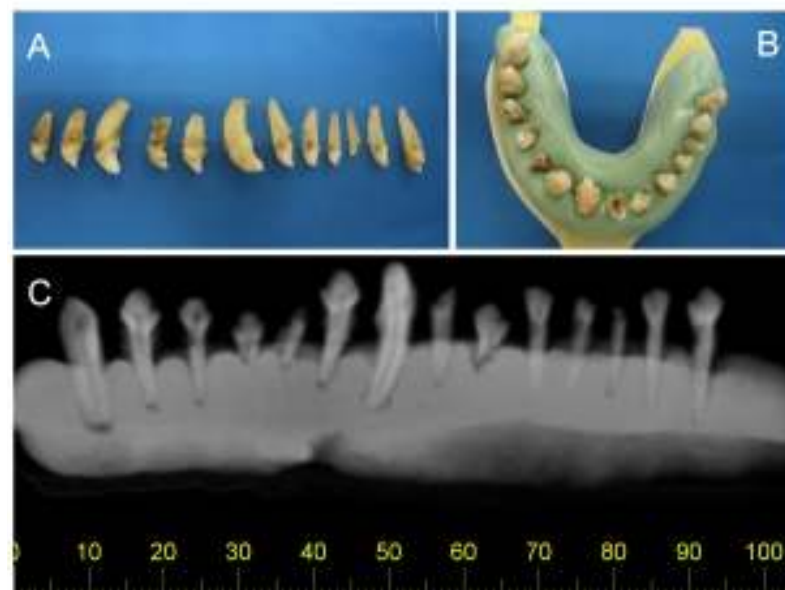


Figura 5. Dentes extraídos 30 dias após os procedimentos clínicos operatórios (A), devidamente montados para tomada tomográfica volumétrica de feixe cônico (*cone beam*) (B). Visão panorâmica da imagem tomográfica (C).

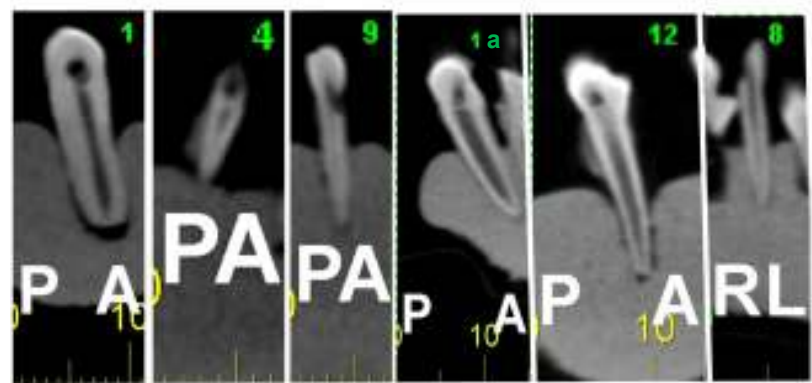


Figura 6. Detalhe da visualização tomográfica da barreira mineralizada em HC (1) e OTL (4), mas não em CTR (9), 21dias após o experimento. Em 30 dias, evidencia-se barreira bem formada tomograficamente em HC (1a) e OTL (12) e ausência desta estrutura em CTR (8).

Tabela 1. Distribuição dos valores absolutos e relativos da frequência de observação radiográfica de barreira mineralizada nos espécimes dentários.

Tempo	Barreira Mineralizada	Grupos					
		CTR n (%)		HC n (%)		OTL n (%)	
		AR	AT	AR	AT	AR	AT
21dias	Presente	0 (0)	1 (33,3)	3 (100)	3 (100)	6 (100)	6 (100)
	Ausente	3 (100)	2 (66,6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Total	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	6 (100)	6 (100)
30 dias	Presente	2 (66,6)	0 (0)	3 (100)	3 (100)	5 (83,3)	5 (83,3)
	Ausente	1 (33,3)	3 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (16,6)	1 (16,6)
	Total	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	6 (100)	6 (100)

AR: Análise radiográfica; AT: Análise tomográfica.

Após descalcificação e hemiseção, foi possível observar macroscopicamente estrutura rígida em ponte, compatível com barreira mineralizada, em alguns dos espécimes de HC e OTL (figura 7), sugerindo fortemente o sucesso do experimento.

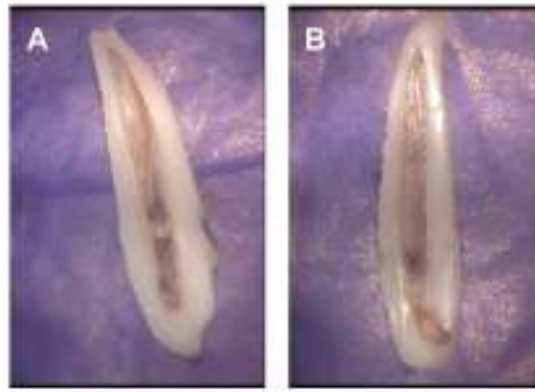


Figura 7. Evidenciação macroscópica de estrutura compatível com barreira mineralizada na zona de exposição pulpar em dente capeado com HC (A) e OTL (B) 30 dias após os procedimentos clínicos operatórios.

Os resultados da avaliação histológica mostraram que o capeamento da polpa com otólitos estimulou a formação de dentina reparadora mineralizada 21 dias e 30 dias após experimento, com a formação de ponte adjacente ao material, ora contínua, ora descontínua, em 100% (n=6) dos espécimes do grupo HC e em 83,3% (n=10) dos espécimes do grupo OTL. Nenhum espécime (n=6) do grupo controle negativo (CTR), em 21 e em 30 dias, demonstrou formação de barreira mineralizada e revelou necrose parcial ou total da polpa em 50% (n=3) dos espécimes.

Em 21 dias, foi histologicamente evidenciada a formação de barreira mineralizada, ora contínua, ora descontínua, em todos os espécimes do grupo HC e em 66,6% dos espécimes do grupo OTL. Já em 30 dias, todos os dentes de ambos os grupos experimentais exibiram formação de barreira mineralizada. Nenhum espécime do grupo controle (CTR), em 21 e em 30 dias, demonstrou formação de barreira mineralizada (tabela 2). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos OTL e HC quanto à formação e tipo de barreira dentinária ($p>0,05$).

De especial interesse foi a evidenciação de que as características histológicas da barreira mineralizada eram distintas entre os grupos. No grupo HC, a barreira era formada por um tecido eosinofílico homogêneo, de espessura variável, sem inclusão de células no interior da matriz, consistente com material dentinário e exibindo pavimentação por células ovaladas dispostas em fileiras irregulares pseudo-estratificadas que eram consistentes com odontoblastos. No grupo OTL, por outro lado, observava-se a deposição de matriz irregular e delgada de aspecto osteóide que se organizava ao redor de núcleos basofílicos amorfos grosseiramente granulares compatíveis com calcificação distrófica (figuras 8 e 9).

Tabela 2. Distribuição dos valores absolutos e relativos da frequência de observação histológica de barreira mineralizada nos espécimes dentários.

Tempo	Barreira Mineralizada	Grupos		
		CTR	HC	OTL
		n (%)	n (%)	n (%)
21dias	Contínua	0 (0)	2 (66,6)	2 (33,3)
	Descontínua	0 (0)	1 (33,3)	2 (33,3)
	Ausente	3 (100)	0 (0)	2 (33,3)
	Total	3 (100)	3 (100)	6 (100)
30 dias	Contínua	0 (0)	2 (66,6)	3 (50)
	Descontínua	0 (0)	1 (33,3)	3 (50)
	Ausente	3 (100)	0 (0)	0 (0)
	Total	3 (100)	3 (100)	6 (100)

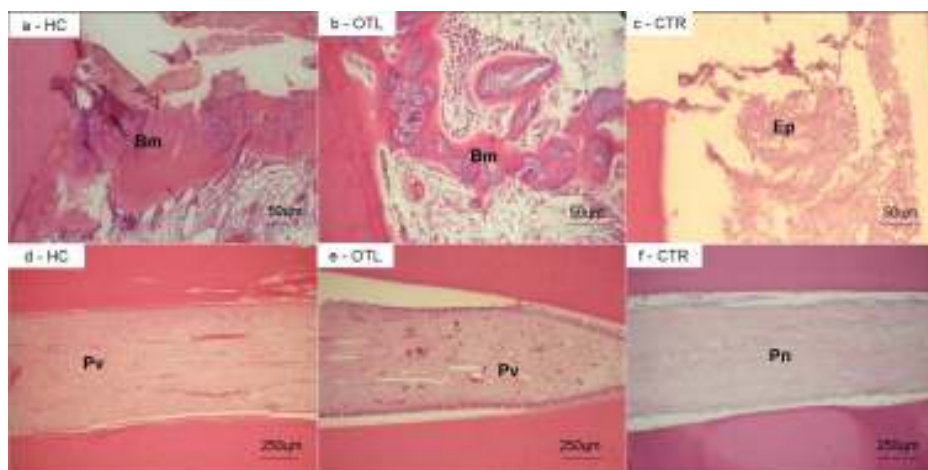


Figura 8. Secções histológicas coradas em HE dos espécimes processados 21 dias após os procedimentos clínicos operatórios. Formação de barreira mineralizada (Bm) nos grupos capeados com hidróxido de cálcio (HC) (a) e otólitos (OTL) (b). Grupo controle (CTR) (c) exibindo ausência de formação mineral na zona de exposição pulpar (Ep). No terço médio da polpa radicular, os grupos HC (d) e OTL (e) apresentam intensa rede vascular composta por capilares hiperemiados (Pv), enquanto que o grupo CTR (f) exibe sinais de necrose (Pn).

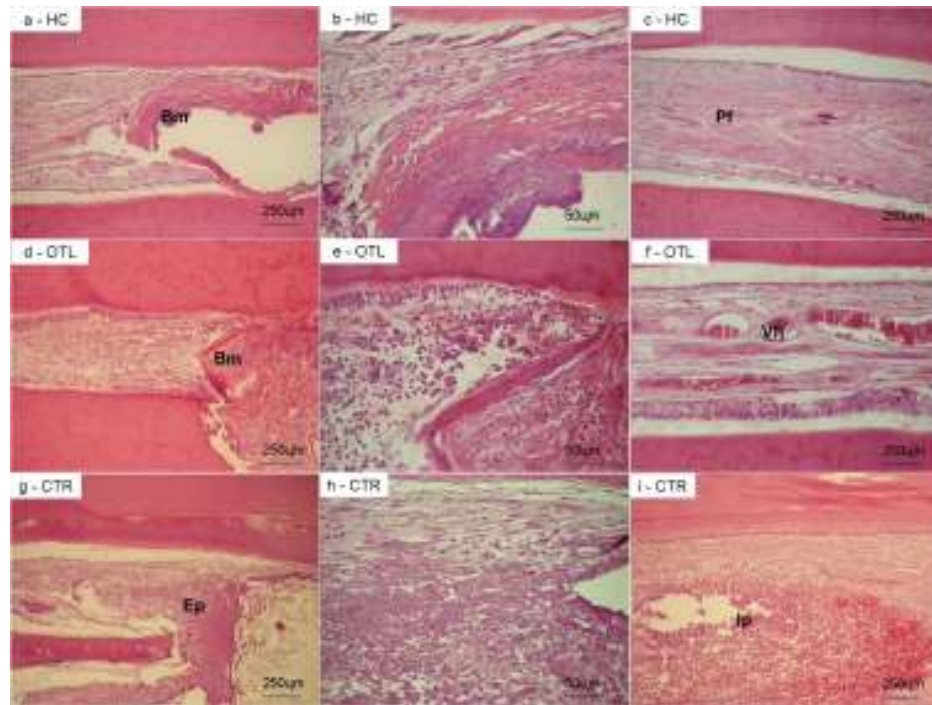


Figura 9. Secções histológicas coradas em HE dos espécimes processados 30 dias após os procedimentos clínicos operatórios. Formação de barreira mineralizada (Bm) em HC (a) e OTL (d), e ausência de formação em CTR (g) na zona de exposição pulpar (Ep). Adjacente a zona de exposição, observa-se inflamação crônica escassa em HC (b) e moderada em OTL (e), mas aguda em CTR (h). No terço médio da polpa radicular, observa-se polpa fibrótica (PF) em HC (c) e grande quantidade de vasos hiperemiados (Vh) em OTL (f). Em CTR (i), evidencia-se infiltração inflamatória rica em polimorfonucleares (Ip), caracterizando inflamação aguda.

A análise da reação inflamatória da polpa radicular mostrou que, de modo geral, a infiltração leucocitária tendia a ser maior na porção cervical, nas adjacências da zona de exposição pulpar, sofrendo redução substancial à medida que passava para o terço médio e apical. Em 21 dias, o padrão de infiltração inflamatória foi bastante similar entre os grupos, observando-se, nos terços cervicais, tendência a inflamação variando de moderada a intensa, com perfil leucocitário predominante bastante diversificado, ora neutrofílico, ora mononuclear, e por vezes havendo equilíbrio entre essas duas populações leucocitárias. Nos terços médios e apicais, a inflamação variou entre leve e ausente, com predomínio de linfócitos e plasmócitos. Em 30 dias, a intensidade da reação inflamatória no terço pulpar cervical sofreu uma discreta redução em HC, mas pareceu aumentar de intensidade em CTR e OTL. Neste último grupo, pareceu também haver um processo de reagudização, com aumento da população neutrofílica. Nos terços médios e apicais, a intensidade da infiltração variou entre leve e ausente, e o perfil inflamatório, quando presente, permaneceu crônico. Contudo, necrose foi observada em

dois espécimes do grupo CTR em 21 dias e em um espécime em 30 dias (tabela 3). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos nem em 21 nem em 30 dias quanto à intensidade do infiltrado inflamatório ($p>0,05$).

Tabela 3. Avaliação semiquantitativa dos achados histológicos observados na polpa dentária dos espécimes analisados

Tempo	1/3 pulpar	Grupos											
		CTR				HC				OTL			
21 dias	Cervical	2*	n	2	3*	3*	2	2	2	2*	2	3*	2
	Médio	n	n	2	3	2	0	1	1	0	0	2	1
	Apical	n	n	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30 dias	Cervical	2*	3*	n	2*	2	2	1	3*	3*	2	3*	3*
	Médio	2	3	n	1	1	1	0	2	1	1	1	2
	Apical	2	0	n	0	0	0	0	0	1	1	0	0

Legenda: (3) Inflamação intensa; (2) inflamação moderada; (1) inflamação leve; (0) ausência de inflamação; (n) polpa necrótica; (*) infiltração aguda rica em neutrófilos.

Ressalta-se que, tanto em 21 quanto em 30 dias, as polpas vitais exibiram, mesmo em áreas com ausência de infiltração inflamatória digna de nota, proeminente hiperemia. Além disso, em 30 dias foi observada fibrose importante das polpas vitais, particularmente observadas nos terços médio e apical.

Quando a presença ou a ausência de barreira mineralizada observada radiográfica e tomograficamente foi comparada com a análise histológica dos espécimes pulpaes, foi evidenciada 75% de coincidência de diagnóstico. Contudo, individualizando os exames imaginológicos e comparando-os com os achados histológicos, constatou-se um percentual de coincidência de 79,16% para a análise radiográfica e 87,5% para a tomográfica (quadro 1).

Quadro 1. Estudo comparativo da acurácia dos métodos de diagnóstico radiográfico e tomográfico em relação ao histológico para visualização de barreira mineralizada em espécimes dentários tratados com proteção pulpar direta com hidróxido de cálcio, preparado gelatinoso de otólitos e não tratados.

Período experimental	Método de Diagnóstico	Espécimes											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
21 dias	AR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	AT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	AH	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
30 dias	AR	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
	AT	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	AH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

AR: Análise radiográfica; AT: Análise tomográfica; AH: Análise histológica

5 - DISCUSSÃO:

A utilização de cães neste estudo demonstrou ser um modelo experimental adequado para avaliar a resposta pulpar no capeamento direto de dentes com diferentes materiais odontológicos e se encontra em consonância com inúmeros estudos citados na literatura contemporânea. Em um mesmo animal foi possível testar o HC e o preparado de otólitos, reduzindo o viés provocado pela variabilidade biológica existente em animais diferentes, ainda que de espécies semelhantes, assim como a necessidade de um número maior de animais. O critério de seleção do modelo canino obedece à hierarquia da pesquisa exigida para avaliação de novos materiais previamente à execução de testes em seres humanos (FAGUNDES & TAHA, 2004). Além disso, o fato de que não foi necessária a eutanásia dos animais para a obtenção dos espécimes dentários e a garantia de adoção após o período de experimentação representaram aspectos positivos de extrema relevância neste trabalho.

Independentemente das propriedades favoráveis de qualquer material protetor, o sucesso da terapia pulpar é também determinado por uma cadeia de procedimentos corretos, desde a seleção do caso, profilaxia, isolamento absoluto, irrigação, preparo da exposição, condições de saúde e contaminação do remanescente pulpar, contenção da hemorragia, íntimo contato do material protetor com o remanescente, selamento cavitário, tempo de atuação do material protetor até a obtenção da resposta tecidual (MONDELLI, 1998; TORRES et al, 2000). Antes da opção pelo medicamento a ser utilizado como material de proteção pulpar direta é importante a análise e o diagnóstico das condições pulpares prévias, já que o reparo desse tecido depende da sua própria capacidade de regeneração (TORRES et al, 2000; WIENANDTS et al, 2002; MARION et al, 2005; MORETTI et al, 2008). Neste experimento, todos os parâmetros citados foram utilizados a fim de evitar vieses de contaminação exógena.

O controle da hemorragia após a exposição da polpa coronária é considerado uma variável importante para que não fique coágulo sanguíneo entre o remanescente pulpar e o material capeador e todo cuidado foi tomado a fim de evitar esta interferência em relação aos materiais testados (MONDELLI, 1998; BALDISSERA, 2006; MORETTI et al, em 2008). Neste experimento, a contenção da hemorragia pulpar causada pela exposição foi contida com irrigação e secagem com bolinhas de algodão estéreis embebidas em solução fisiológica. Dessa maneira, foi possível evitar a formação do

coágulo espesso que também poderia prejudicar a ação do material usado para o capeamento. Além disso, o veículo utilizado foi a água destilada, como sugerido por Estrela & Pécora (1997).

Em relação aos períodos de estudo da resposta pulpar de 21 e 30 dias, estes foram determinados com a finalidade de observar a resposta pulpar e ter parâmetro de comparação com outros trabalhos que avaliaram materiais empregados no capeamento pulpar (HOLLAND et al, 1981; KOLINIOTOU-KOUMPIA & TZIAFASB, 2005; ALBUQUERQUE et al, 2006; HOLLAND et al, 2006), posto que a literatura relata que a formação da dentina pode demorar 15 dias após o experimento (ESTRELA & HOLLAND, 2003). Corroborando estes dados, neste estudo pode-se observar a formação, tanto para o HC quanto para os otólitos, de tecido mineralizado a partir de 21 dias após o experimento.

Existem, no mercado, diferentes materiais para a proteção pulpar direta, mas é importante explorar novas alternativas que possam também apresentar propriedades biológicas e bioquímicas aceitáveis, ser de fácil manuseio e ter um baixo custo.

Como o principal indicador de sucesso na proteção pulpar direta ou na pulpotomia é a formação de barreira dentinária, o HC foi selecionado para o grupo controle positivo por suas propriedades (biocompatibilidade, atividade antibacteriana e estimulação e deposição de tecido mineralizado) que estimulam o processo de cicatrização (ESTRELA et al, 1995, ESTRELA & HOLLAND, 2003; QUEIROZ et al, 2005) e por ser considerado um material com potencial de manter a vitalidade do remanescente pulpar (HOLLAND et al, 1981; MONDELLI, 1998; TORRES et al, 2000; HOLLAND et al, 2006; ALBUQUERQUE et al, 2006; MODENA et al, 2009). No entanto, sabe-se que o efeito do HC sobre o tecido pulpar inicialmente é destrutivo, provocando lesão química causada por íons hidroxila que apresentam pH altamente alcalino, levando à necrose superficial da polpa com uma leve irritação. Esta área de necrose, quando a polpa não é protegida por um bom selamento marginal obtido com materiais restauradores, pode resultar em falhas e dificultar a formação de tecido mineralizado (TORRES et al, 2000; MARION et al, 2005; BRISO et al, 2006; MODENA et al, 2009).

Tem sido demonstrado que a composição química dos otólitos, representada pelo alto conteúdo de CaCO_3 , fixados em uma matriz orgânica constituída de proteínas colagênicas de alto peso molecular (otolina-1 e proteína de matriz de otólitos-1) poderia determinar uma possível atividade biológica associada a biomineralização de tecidos

ósseos e dentinários (WIENANDTS et al, 2002; MURAYAMA et al, 2002). Os otólitos, do *Cynoscion acoupa*, além de poderem ser extraídos da pescada amarela em toda a costa brasileira, são de fácil manuseio e apresentam baixo custo. Desta forma, foi avaliado, no presente estudo, o papel desempenhado por otólitos de *Cynoscion acoupa* no processo de formação de barreira mineralizada em polpas dentais experimentalmente expostas de cães.

Nesta pesquisa, a utilização do HC em polpas dentárias expostas de cães induziu a formação de barreira mineralizada em todos os espécimes, independente do período experimental. Resultados semelhantes foram obtidos em outros estudos (HOLLAND et al ,2006; ALBUQUERQUE et al, 2006), atestando a eficácia deste biomaterial como agente de proteção pulpar direta e justificando seu emprego como controle positivo neste trabalho. A utilização de otólitos (OTL), por sua vez, levou a formação histológica de barreira mineralizada em 66,6% dos espécimes em 21 dias e 100% em 30 dias. No entanto, essas diferenças não foram estatisticamente significativas. Além disso, também não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos quanto ao padrão de continuidade da barreira formada, se contínua ou descontínua. Estes dados sugerem que ambos os materiais tiveram potencial de indução de barreira mineralizada semelhantes.

No grupo controle negativo (CTR), em ambos os intervalos de tempo, 21 e 30 dias após o capeamento, não se observou a formação de barreira obliterando a exposição, indicando que a indução de tecidos duros reparativos foi, de fato, um fenômeno associado à presença dos biomateriais utilizados neste estudo. Contudo, o padrão morfológico da barreira mineralizada formada nos dois grupos apresentaram algumas diferenças, sendo aquela produzida pelo HC compacta, espessa e acelular, exibindo aspecto dentinoide, enquanto que a formada pelo OTL se apresentou mais delgada, trabecular e celular, com aspecto osteoide. Estas diferenças poderiam estar relacionadas ao mecanismo de deposição mineral induzido por estes materiais. A mineralização provocada pelo HC parece estar relacionada ao seu pH extremamente alcalino e à sua atividade antibacteriana (ESTRELA et al, 1995, ESTRELA & HOLLAND, 2003; HOLLAND et al ,2006).

A alcalinidade do material levaria a um quadro de desnaturação proteica e consequente necrose coagulativa promovida pela ação tóxica dos íons hidroxila (ESTRELA & HOLLAND, 2003; HOLLAND et al, 2006). Os íons hidroxila liberados pelo material agiriam diretamente nas membranas celulares induzindo peroxidação lipídica e

consequente liberação de ácidos graxos. A lesão de membrana conduziria à necrose coagulativa secundária e à desnaturação proteica celular, enquanto que o acúmulo de ácidos graxos, com alta afinidade por sais de cálcio, determinaria a formação de focos de mineralização estromal (ESTRELA & HOLLAND, 2003). Além disso, estudos indicam que o pH elevado do HC ativa a fosfatase alcalina, enzima responsável pela liberação do fosfato inorgânico a partir de ésteres de fosfato. Os íons fosfato livres reagiriam com íons cálcio da corrente sanguínea, formando um precipitado de fosfato de cálcio, unidade molecular da hidroxiapatita, na matriz biológica (ESTRELA et al, 1995; ESTRELA & HOLLAND, 2003; WITHERSPOON et al, 2006).

O mecanismo de ação deflagrado pelos otólitos na dinâmica da formação da barreira mineralizada em tecido pulpar ainda é desconhecido. Contudo, tem sido sugerido que o mecanismo de mineralização dos otólitos em peixes esteja intimamente relacionado à participação de moléculas de colágeno, de maneira similar àquela deflagrada para calcificação dos ossos e dentina. Foi demonstrado que a proteína otolina-1 encontrada em otólitos tem grande homologia com o colágeno VIII e X, moléculas relacionadas com a mineralização de matrizes proteicas não calcificadas (SUTMULLER et al, 1997; FALINI et al, 2005). A otolina-1 parece representar o local de nucleação para precipitação de cristais de carbonato de cálcio durante a mineralização do otólito (ROMANECK & GAULDIE, 1996). Além disso, otólitos são ricos em carbonato de cálcio e outros constituintes inorgânicos associados à dinâmica da mineralização (CAMPANA & NEILSON, 1984). Deste modo, conquanto agregados de otolina-1 se assemelham quimicamente a tais moléculas de colágeno, é possível que possam atuar como sítios para nucleação de depósitos cálcicos e facilitar o processo de mineralização, utilizando carbonato de cálcio da mesma forma que o colágeno propicia a calcificação em ossos e dentina, utilizando o fosfato de cálcio (MURAYAMA et al, 2002). A observação histológica de formação osteoide ao redor de núcleos basofílicos semelhantes à calcificação distrófica parece apoiar essa teoria. Adicionalmente, o pH dos otólitos (8,7) também poderia interferir no mecanismo de formação de barreira mineralizada, já que se encontra dentro dos limites de pH ótimo para a ativação da fosfatase alcalina (8,6 a 10,3) (ESTRELA & HOLLAND, 2003). Estudos posteriores são necessários para elucidar a natureza do mecanismo de ação dos otólitos na formação de barreira mineralizada em polpas dentais expostas.

Um dado relevante foi que, nos grupos HC e OTL, se observou a presença de reação inflamatória pulpar, ainda que de moderada ou leve intensidade. Esses achados

contrariam aqueles evidenciados em outros estudos (HOLLAND et al, 1981; HOLLAND et al, 2006; FARACO JÚNIOR & HOLLAND, 2001, QUEIROZ et al, 2005), que afirmam que o HC não produz resposta inflamatória pulpar.

No entanto, o mecanismo de ação do HC correntemente descrito na literatura indica a liberação de íons OH^- nos tecidos, um radical livre potencialmente tóxico e capaz de induzir reação inflamatória (ESTRELA et al, 1995, ESTRELA & HOLLAND, 2003). Adicionalmente, são comumente descritas áreas superficiais de necrose no tecido pulpar quando em contato com HC (ESTRELA & HOLLAND, 2003; HOLLAND et al, 2006). Considerando que o próprio material necrótico funciona como agente flogógeno, a existência de uma reação inflamatória seria um evento absolutamente esperado. Portanto, os achados observados neste estudo são compatíveis com o mecanismo de ação do HC e a maior concentração de leucócitos na porção adjacente ao material protetor pulpar parece ratificar esta teoria. Também deve ser ressaltado que a baixa magnitude da resposta flogística é fortemente sugestiva de que não estão sendo impetrados danos tissulares maiores que poderiam comprometer a capacidade regenerativa do tecido pulpar.

Contudo, pareceu haver um discreto aumento da reação inflamatória em OTL no tempo de 30 dias, embora esta diferença não tenha se revelado estatisticamente significativa. Esse fenômeno poderia estar relacionado com a persistência de estímulos flogísticos no tecido pulpar exposto após os procedimentos operatórios (TORRES et al, 2000). Conquanto a boca seja um local contaminado, mesmo sob condições de descontaminação e biossegurança, não é possível assegurar a assepsia da polpa durante os procedimentos operatórios e o adequado selamento durante o período em que se aguarda a resposta pulpar à proteção direta. Assim, a aparente melhor performance do HC quanto ao controle da resposta inflamatória poderia estar associada ao seu elevando potencial antibacteriano (HOLLAND, 1971; ESTRELA & HOLLAND, 2003), o que reduziria drasticamente a chance de proliferação bacteriana local. No entanto, a despeito deste fator, houve sucesso na formação de barreira mineralizada, atestando a aplicabilidade do biomineral (otólitos) para proteção pulpar direta. Esses dados também parecem demandar a realização de estudos posteriores, associando o preparado de OTL a agentes antibióticos tópicos.

Uma vez que apenas células pulpares viáveis são capazes de neoformação tecidual (TORABINEJAD et al, 1995), os otólitos parecem apresentar biocompatibilidade e potencial para estimular a formação de tecido duro, provavelmente por serem

constituídos de carbonato de cálcio e proteínas colagênicas homólogas ao colágeno VIII e X. Desta forma, os resultados encontrados com o uso do OTL recomendam sua aplicação para proteção pulpar direta. No entanto, em contraposição ao HC que, além do baixo custo, é facilmente encontrado e tem apresentado excelentes resultados clínicos, radiológicos e histológicos, os estudos investigativos acerca do potencial dos otólitos como biomaterial de uso odontológico são recentes e necessitam de mais pesquisas, particularmente associando o preparado de OTL a agentes antibióticos tópicos.

Adicionalmente, os resultados apresentados neste estudo dizem respeito a capeamentos realizados com otólitos em polpas sãs e, portanto, sem contaminação e sem inflamação. É necessário saber se, diante de uma polpa previamente exposta ao meio oral, o comportamento seria o mesmo do HC pró-análise.

Um ponto de extrema relevância neste trabalho foi a análise imaginológica dos espécimes. A identificação de barreira mineralizada pode ser realizada tanto por meio de avaliação radiográfica quanto por tomografia computadorizada volumétrica de feixe cônico (*cone beam*) com índice de coincidência dos achados imaginológicos e histológicos maior para a tomografia. A eficácia da tomografia *cone beam* vem sendo recentemente apontada em estudos recentes prévios (YOUNG et al., 2009). Além disso, estes dados parecem sugerir que, diante da impossibilidade da análise histológica, a tomografia com tecnologia *cone beam* parece representar um método mais seguro e fidedigno para estudo da formação de barreira mineralizada em polpas dentais do que o radiográfico.

Pelos fatos expostos podemos afirmar que, mediante a metodologia adotada neste trabalho, os otólitos têm capacidade de induzir a formação de barreira mineralizada em tecido pulpar em razão de sua excelente resposta biológica demonstrada no estudo, *in vivo*. Embora o presente trabalho represente uma contribuição inovadora na pesquisa odontológica e as propriedades físicas, químicas e biológicas dos otólitos, somadas à sua aplicabilidade clínica, indiquem uma atuação promissora na odontologia, pesquisas futuras devem ser realizadas em busca de novas opções de formulações deste material capeador direto, associado ou não a antibióticos, antiinflamatórios, corticóides, etc., tendo em vista a obtenção de um melhor desempenho deste produto.

Talvez em um futuro próximo se obtenha uma formulação de otólitos considerada ideal para a proteção direta de polpas expostas que não agrida aos tecidos vivos e induza

a formação de barreiras mineralizadas sem defeitos ou vazios, selando biologicamente a comunicação pulpar da cavidade bucal.

6 - CONCLUSÕES:

- Os otólitos apresentaram biocompatibilidade com os tecidos pulparens *in vivo*.
- A resposta tecidual pulpar ao uso de otólitos foi análoga à produzida pelo hidróxido de cálcio, apoiando a teoria de que o otólito também é um material com capacidade de preservar a vitalidade pulpar e induzir a formação de barreira mineralizada e a resposta pulpar reparadora.

7 - REFERÊNCIAS:

ANDRADE AL, DOMINGUES RZ. Cerâmicas bioativas – estado da arte. Quím Nova. 2006;29(1):100-4.

ALBUQUERQUE DS, GOMINHO LF, SANTOS RA. Histologic evaluation of pulpotomy performed with ethyl-cyanoacrylate and calcium hydroxide. Braz Oral Res. 2006;20(3):226-30.

ALCURE ML. Análise morfológica microscópica da barreira dentinária formada após aplicação do hidróxido de cálcio em polpas dentárias humanas. 2001; 90f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Tese. 2001, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru.

AMERICAN DENTAL ASSOCIATION. COUNCIL ON DENTAL MATERIALS AND DEVICES. Recommended standart practices for biological evaluation of dental materials. J. Am. Dent Assoc. 1972;84(2):382-7.

BALDISSERA EFZ. Avaliação da expressão da fibronectina e tenascina após capeamento pulpar utilizando diferentes agentes hemostáticos (modelo humano) e diferentes materiais capeadores (modelo animal). Tese Doutorado. 2006, Faculdade de Odontologia. Universidade Federal de Pelotas.

BARBOSA VH, SAMPAIO GC, GOMES FA, OLIVEIRA DP, ALBUQUERQUE DS, SOBRAL APV. Short-term analysis of human dental pulps after direct capping with Portland cement. The open dentistry journal. 2009;3:31-5.

BORELLI G, MAYER-GOSTAN N, MERLE PL, DE PONTUAL H, BOEUF G, ALLEMAND D, et al. Composition of biomineral organic matrices with a special emphasis on turbot (Psetta maxima) otolith and endolymph. Calcif Tissue Int. 2003;72(6):717-725.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Área Técnica de Saúde Bucal. A reorganização da saúde bucal na atenção básica. Divulg Saúde Debate. 2000;21:68-73.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção Básica. Departamento de Atenção Básica. Coordenação Nacional de Saúde Bucal. Projeto SB Brasil 2003 – condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003: resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde, 2004. 52p.

BRISO ALF, RAHAL V, MESTRENER SR, DEZAN-JUNIOR E. Biological response of pulps submitted to different capping materials. *Braz Oral Res.* 2006;20(3):219-25.

CAMPANA SE, NEILSON JD. Microstructure of fish otoliths. *Can J Fish Aquat Sci.* 1985;42(5):1014-1032.

CAMPANA SE, THORROLD SR. Otoliths, increments and elements: keys to a comprehensive understanding of fish populations? *Can J Fish Aquat Sci.* 2001;58(1):30-8.

CASTILHO C, COUTO LB, SOUZA-GABRIEL AE, PEREZ DEC, NUNES FD, CRUZ-FILHO AM. Avaliação da atividade antiinflamatória de AINEs em tecido pulpar de ratos. *Robrac.* 2008;17(43):32-8.

CHIBINSKI ACR, CZLUSNIAK GD. Utilização do agregado trióxido mineral (MTA) em pulpotomias de dentes decíduos: relato de caso. *Ci Biol Saúde.* 2003;9(3/4): 21-7.

COSTA CAS, HEBLING J, HANKS CT. Current status of pulp capping with dentin adhesive system: a review. *Dent Mater.* 2000;16(3):188-97.

COSTA CAS, NASCIMENTO ABL, TEIXEIRA HM. Response of human pulps following acid conditioning and application of a bonding agent in deep cavities. *Dent Mater.* 2002;18(7):543-51.

DEGENS ET, DEUSER WG, HAEDRICH RL. Molecular structure and composition of fish otoliths. *Marine Biol.* 1969;2(2):105-13.

ESTRELA C, PÉCORA DJ. Hidróxido de cálcio na endodontia. Desenvolvimento de material didático ou instrucional - hipertexto didático, 1997. Endereço eletrônico: <http://www.forp.usp.br/restauradora/calcao/hidroca.htm> – acesso em 08/09/2009.

ESTRELA C, SYDNEY G.B, BAMMANN LL, FELIPPE JÚNIOR O. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J.* 1995;6(2):85-90

ESTRELA C, PESCE HF. Chemical analysis of the liberation of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide pastes in the presence of connective tissue of the dog. Part I. Braz Dent J. 1996;7(1):41-6.

ESTRELA C, HOLLAND, R. Calcium hydroxide: study based on scientific evidences. J Appl Oral Sci. 2003;11(4):269-82.

ESTRELA C, FIGUEIREDO JAP. Endodontia: princípios biológicos e mecânicos. São Paulo: Artes Médicas; 2001.

FAGUNDES DJ, TAHA M.O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. Acta Cir Bras. 2004;19(1):59-65.

FALINI G, FERMANI S, VANZO S, MILETIC M, ZAFFINO G. Influence on the formation of aragonite or vaterite by otolith macromolecules. Eur J Inorg Chem. 2005;162-7.

FARACO JÚNIOR IM, 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.

FINKEMEIER CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. J Bone Joint Surg. 2002;84(3):454-65.

FRARE SM, LIMAS PA, ALBARELLO FJ. Terceira idade: quais os problemas bucais existentes? Rev Assoc Paul Cir Dent. 1997;51:573-6.

GIRO EMA, IOST HI, LIA RCC. Análise histopatológica comparativa em polpa de dentes de cães, após pulpotomia e utilização de pastas a base de hidróxido de cálcio em diferentes veículos. Rev. Odontol. 1994;23(2):191-201.

HEBLING J, GIRO EMA, COSTA CAS. Human pulp response after na adhesive system application in deep cavities. J Dent. 1999;27(8):557-64.

HOLLAND, R. Histochemical response of amputated pulps to calcium hydroxide. Rev. Bras. Pesq. Med. e Biol. 1971;4(2):83-95.

HOLLAND R, MELLO W, NERY MJ, SOUZA V, BERNABE PF, OTOBONI FILHO JA. Healing process of Dog's dental pulp after pulpotomy and pulp covering with calcium hydroxide in powder or paste form. Acta Odontol Pediatr. 1981;2(2):47-51.

HOLLAND R, GONZÁLES AC, SOUZA V, NERY MJ, BERNABÉ PFE, OTOBONI FILHO JA. Recambio dei hidróxido de cálcio después de la pulpotomia y su influencia en la reparación. Estudio histológico en dentes de monos. Endodoncia. 1999;17:35-45.

HOLLAND R, SOUZA V, DELGADO MJR, MURATA SS. Agregado de trióxido mineral (MTA): composição, mecanismo de ação, comportamento biológico e emprego clínico. Revista Ciências Odontológicas. 2002;5(5):7-21.

HOLLAND R, SOUZA V, MURATA SS. Conservative pulp therapy. Revista Ciências Odontológicas. 2006;9(9):25-41.

KITASAKO Y, ARAKAWA M, SONODA H. Light and scanning electron microscopy of the inner surfaces of resins used in direct pulp capping. Am J Dent. 1999;21(5):217-21.

KOLINIOTOU-KOUMPIA E, TZIAFASB D. Pulpal responses following direct pulp capping of healthy dog teeth with dentine adhesive systems. J Dent. 2005;33(8):639-47.

LINDE A. Cells and extracellular matrix of the dental pulp. J. Dent. Res. 1985;64(Spec1):523-9.

LOWENSTAM HA, WEINER S. Minerals and macromolecules - On biomineralization. Oxford University Press, New York, 1989.

MAIZATO MJ, PIRES MD, CANZIAN M, HIGA OZ, PITOMBO RN, LEIRNER AA. Histological evaluation of biocompatibility of lyophilized bovine pericardium implanted subcutaneously in rats. Artif Organs. 2008;32(4):268-71.

MANN S. Biomineralization (Mann 5° edição – 5 Oxford University Press London), 2002.

MARION JJC, BORLINA SC, ANJOS NETO DA, MURATA SS. Pulpotomia e perspectiva de apicigênese. Relato de caso. Revista Ciências Odontológicas. 2005;8(8):51-6.

MASSARA M L.A, NORONHA J C, SOUKI BQ, DINIZ APV, NAVARRO CF, ALENCAR MCB, REIS SAB. A utilização do hidróxido de cálcio em pulpotomia de dentes decíduos. Revista Gaúcha de Odontologia. 1996;44(5):300-4.

MATOS IP, LUCENA F. Descrição da pesca da pescada-amarela, Cynoscion acoupa, da costa do Pará. Arq Ciên Mar. 2006;39:66-73.

MODENA KCS, CASAS-APAYCO LC, ATTA MT, COSTA CAS, HEBLING J, SIPERT CR, NAVARRO MFL, et al. Cytotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials. J Appl Oral Sci. 2009;17(6):544-54.

MONDELLI J. Proteção do complexo dentino-pulpar. São Paulo: Artes Médicas; 1998.

MORIGUCHI Y. Aspectos geriátricos no atendimento odontológico. Odont. Mod. 1992;19(4):11-3.

MORETTI ABS, SAKAI VT, OLIVEIRA TM, FRACASSO MLC, HOSHI A, MACHADO MAAM, ABDO RCC. Avaliação de pulpotomias utilizando formocresol, hidróxido de cálcio e agregado trióxido mineral (MTA) em molares decíduos. Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo. 2008;20(3):247-53.

MORETTI NETO RT, MELLO I, MORETTI AB, ROBAZZA CR, PEREIRA AA. In vivo qualitative analysis of the biocompatibility of different cyanoacrylate-based adhesives. Braz Oral Res. 2008;22(1):43-7.

MURAYAMA E, TAKAGI Y, OHIRA T, DAVIS JG, GREENE MI, NAGASAWA H. Fish otolith contains a unique structural protein, otolin-1. Eur J Biochem. 2002;269(2):688-96.

MURAYAMA E, HERBOMEL P, KAWAKAMI A, TAKEDA H, NAGASAWA H. Otolith matrix proteins OMP-1 and Otolin-1 are necessary for normal otolith growth and their correct anchoring onto the sensory maculae. Mech Dev. 2005;122(6):791–803.

MURAYAMA E, TAKAGI Y, NAGASAWA, H. Immunohistochemical localization of two otolith matrix proteins in the otolith and inner ear of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: comparative aspects between the adult inner ear and embryonic otocysts. Histochem Cell Biol. 2004;121(2):155-66.

NAKATA TT, BAE KS, BAUMGARTNER JC. Perforation and repair comparing mineral trioxide aggregate and amalgam using anaerobic bacterial leakage model. J Endod. 1998;24(3):184-6.

OLSZTA MJ. A new paradigm for biomineral formation: mineralization via an amorphous liquid-phase precursor process. Dissertation, 2004, UNIVERSITY OF FLORIDA, United States of America.

OLSZTA MJ, ODOM DJ, DOUGLAS EP, GOWER LB. A new paradigm for biomineral formation: mineralization via an amorphous liquid-phase precursor process. *Connect Tissue Res.* 2003;44(1):326-334.

PEREIRA APV, VASCONCELOS WL, ORÉFICE RL. Novos biomateriais: híbridos orgânico-inorgânicos bioativos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia.* 1999;Out/Dez:104-9.

PERRY CC, PATWARDHAN SV DESCHAUME O. From biominerals to biomaterials: the role of biomolecule–mineral interactions. *Biochem Soc Trans.* 2009;37(4):687-91

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(10):1491-4.

QUEIROZ AM, ASSED S, LEONARDO MR, NELSON-FILHO P, SILVA LAB. MTA and calcium hydroxide for pulp capping. *J Appl Oral Sci.* 2005;13(2):126-30.

RECH E. A biotecnologia, a sustentabilidade e a biodiversidade brasileira. Disponível em: Http://www.cib.org.br/pdf/biotecnologia_sustetabilidade_biodiversidade20.pdf. Acessado em 14/03/2008.

ROMANECK CS, GAULDIE RW. A predictive model of otolith growth in fish based on the chemistry of the endolymph. *Comp Biochem Physiol.* 1996;114(1):71-9.

RONCALLI AG. Perfil epidemiológico de saúde bucal no Brasil 1986-1996. Disponível em: <Http://www.angelonline.cjb.net>. Acessado em Fev/2005.

ROSA AGF, FERNANDES RAC, PINTO VG, RAMOS LR. Condições de saúde bucal em pessoas de 60 anos ou mais no município de São Paulo (Brasil). *Rev Saúde Pública.* 1992;26:155-60.

ROZA MR. Odontologia veterinária em pequenos animais. Rio de Janeiro: L F Livros; 2004.

SALVEMINI D, WANG ZQ, WYATT PS, BOURDON DM, MARINO MH, MANNING PT, et al. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br J Pharmacol.* 1996;118(4):829-38.

SERVICE RF. Tissue engineers build new bone. *Science.* 2000;289(5484):1498 –500.

SILVA SRC, VALSECKI JÚNIOR A. Avaliação das condições de saúde bucal dos idosos em num município brasileiro. Rev Panam Salud Pública. 2000;8:268-71.

SILVEIRA VAS, PEREIRA AC; AMADEI SU. Aspecto interdisciplinar na pesquisa da biocompatibilidade dos materiais dentários. Rev. Biociên. 2004;10(4):209-13.

SOUZA AE, GANDINI JAD, BARIONE SFA. judicialização do direito à saúde: a obtenção de atendimento médico, medicamentos e insumos terapêuticos por via judicial – critérios e experiências. Disponível em: [HTTP://WWW.jurid.com.br/new/jengine.exe/cpag?p=jornalindicardoutrina&id=45102](http://www.jurid.com.br/new/jengine.exe/cpag?p=jornalindicardoutrina&id=45102). Acessado em 27 Fev. 2008.

SOUZA IMM, OLIVEIRA JF, BEZERRA ALG, MENDONÇA MCFB. Morfologia externa dos otólitos sagittae da pescada branca, *Plagioscion squamosissimus*, presente na Lagoa do Piató, Assê, Rio Grande do Norte. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, IX, 2009, São Lourenço – MG. Anais... São Lourenço – MG, 2009, p. 1-3.

STAMP LK, CLELAND LG, JAMES MJ. Upregulation of synoviocyte COX-2 through interactions with T lymphocytes: role of interleukin 17 and tumor necrosis factor alpha. J Rheumatol. 2004;31(7):1246-54.

SUTMULLER M, BRUIJN JA, HEER E. Collagen types VIII and X, two non-fibrillar, short-chain collagens. Structure homologies, functions and involvement in pathology. Histol Histopathol. 1997;12(2):557-66.

TOHSE H, TAKAGI Y, NAGASAWA H. Identification of a novel matrix protein contained in a protein aggregate associated with collagen in fish otoliths. FEBS J. 2008;275(10):2512-2.

TORABINEJAD M, RASTEGAR AF, KETTERING JD, PITT FORD TR. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. J Endod. 1995;21(3):109-112.

TORRES CRG, CARVALHO JC, VALERA MC, ARAÚJO MAM. Materiais ósseo-indutores para o complexo dentino pulpar. Pós-Grad. Rev. Fac. Odontol. São José dos Campos. 2000;3(1):88-96.

VAZ-DOS-SANTOS AM, SANTOS-CRUZ NN, ROSSI-WONGTSCHOWSKI CLDB. Caracterização dos otólitos sagitta do peixe-lagarto *Bembrops heterurus* Miranda-Ribeiro, 1903 (Teleostei: Percophidae) da região Sudeste-Sul do Brasil. Bioikos. 2007;21(2):69-78.

WIENANDTS P, ARAÚJO FB, VELASCO LEL. Avaliação clínica e radiográfica do MTA como uma alternativa para a proteção pulpar direta em dentes decíduos. Robrac. 2002;11(32):54-7.

WITHERSPOON DE, SMALL JC, HARRIS GZ. Mineral trioxide aggregate pulpotomies: a case series outcomes assessment. J Am Dent Assoc. 2006;137:610-18.

YOUNG SM, LEE JT, HODGES RJ, CHANG TL, ELASHOFF DA, WHITE SC. A comparative study of high-resolution cone beam computed tomography and charge-coupled device sensors for detecting caries. Dentomaxillofac Radiol. 2009;38(7):445-451.

.

ANEXOS:

Anexo I: Parecer do Comitê de Ética da Universidade Tiradentes

Anexo II: Parecer do Comitê de Ética da Faculdade Pio Décimo

Anexo III: Solicitação para cessão dos cães ao Secretário Municipal de Saúde

Anexo IV: Solicitação ao Diretor da Faculdade Pio Décimo de parceria para o financiamento da pesquisa

Anexo V: Extração dos otólitos/trituração/diluição em 100ml de água destilada para aferir pH

Anexo VI: Resultado da aferição do pH

Anexo VII: Esterilizadora

Anexo VIII: Radiopacidade do otólito

Anexo IX: Cavidade oral canina

Anexo X: Profilaxia oral

Anexo XI: Isolamento absoluto da cavidade por arcada

Anexo XII: Preparos cavitários padronizados/Sangramento pulpar

Anexo XIII: Inserção do material de proteção pulpar na cavidade/Material protetor

Anexo XIV: Remoção do excesso do material protetor

Anexo XV: Selamento cavitário com ionômero de vidro

Anexo XVI: Extração do dentes para análise morfométrica

Anexo XVII: Dentes extraídos

Anexo XVIII: Dentes extraídos montados no elastômero para tomografia

Anexo XIX: Tomografia das arcadas

Anexo XX: Imagem tomográfica comprovando ausência ou presença de barreira mineralizada

Anexo XXI: Imagem radiográfica de espécimes após conclusão do experimento

Anexo XXII: Visualização macroscópica de barreira mineralizada

Anexo XXIII: Achados anatomopatológicos após 21 dias do experimento

Anexo XXIV: Achados anatomopatológicos após 30 dias do experimento

Anexo I: Parecer do Comitê de Ética da Universidade Tiradentes

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: UTILIZAÇÃO DE OTÓLITOS EM POLPAS DENTAIS DE CÃES PÓS-PULPOTOMIA: UM ESTUDO EXPERIMENTAL COMPARATIVO		
Pesquisador Responsável Daisy Pereira Valido		
Data da Versão 06/05/2009	Cadastro 030505	Data do Parecer 03/06/2009
Grupo e Área Temática III - Projeto fora das áreas temáticas especiais		
Objetivos do Projeto OBJETIVO GERAL: Avaliar comparativamente com o hidróxido de cálcio e o MTA a ação de biomínereis (otólitos de pescada amarela) no processo de neoformação dentinária após exposição pulpar artificialmente induzida em cães. OBJETIVO ESPECÍFICO: - o Analisar radiograficamente a barreira dentinária formada após a aplicação do hidróxido de cálcio, do agregado mineral de trióxido e de otólitos em polpas dentárias expostas de cães. - o Analisar histomorfologicamente a barreira dentinária formada após a aplicação do hidróxido de cálcio, do agregado mineral de trióxido e de otólitos em polpas dentárias expostas de cães. - o Analisar morfometricamente a barreira dentinária formada após a aplicação do hidróxido de cálcio, do agregado mineral de trióxido e de otólitos em polpas dentárias expostas de cães. - o Comparar a eficácia da atividade de neoformação dentinária dos materiais testados em polpas expostas de cães.		
Sumário do Projeto O hidróxido de cálcio (HC) ainda é o material mais aceito para proteção pulpar direta, sabe-se que quando é colocado em contato com o tecido da polpa preserva a sua vitalidade, sem provocar resposta inflamatória, estimulando a formação de barreira de tecido dentinário mineralizado (BRISO et al, 2006; TORRES et al, 2000). O agregado mineral de trióxido (MTA) é um cimento dental recomendado para o selamento marginal de retrocavidades entre os dentes e os tecidos peridontais. Otólitos são concreções calcárias do ouvido interno dos peixes ósseos, ricos em carbonato de cálcio e em uma proteína colagênica de alto peso molecular denominada otolina (CAMPANA; NELSON, 1984). Adicionalmente, existem nestas estruturas, além do carbonato cálcio, elementos metálicos e não metálicos (BORELLI et al, 2003). Considerando as características físico-químicas dos otólitos e sua potencialidade de ação como biomínereis, constitui proposição deste projeto, avaliar a possível atividade estimulatória destes biomínereis sobre a formação de barreira dentinária e sua aplicação clínica como material de capeamento pulpar direto. Utilizar-se-á 02 cães, os quais anestesiados e após o isolamento absoluto do campo operatório, realizar-se-á exposição padronizada da polpa, proteção com os materiais capeadores testados e selamento das cavidades com lantânio de vidro. Após 15 e 30 dias, os dentes serão extraídos, as peças processadas para a análise microscópica dos dentes e observação histomorfológica da barreira dentinária formada. Diante do narrado, justifica-se por propor-se a avaliar comparativamente histomorfológica, radiográfica e morfometricamente com o hidróxido de cálcio e o MTA a ação de biomínereis (otólitos de pescada amarela) no processo de neoformação dentinária após exposição pulpar proposadamente induzida, espera-se concluir que esta técnica é de fácil execução, baixo custo, com sucesso previsível e deve ser indicada nos serviços públicos de saúde pelo seu caráter socioeconômico, contribuindo para diminuição do alto índice de perdas dentárias precoces.		
Item Metodológico e Ética	Avaliação	
Título	Adequado	
Autores	Adequados	
Lugar de Origem na Instituição	Adequado	

Página 1-2


Bárbara Lima Simioni Leite
 Coord. Comitê de Ética em Pesquisa
 Universidade Tiradentes

Projeto elaborado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Não necessita
Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Não
Condições para realização	Adequadas

Comentários sobre os itens de identificação

RESUMO - o resumo apresenta-se bem caracterizado. Contudo, chamamos atenção para a desnecessidade da utilização de citações no corpo dessa etapa do trabalho.

Introdução	Adequada
------------	----------

Comentários sobre a Introdução

Objetivos	Adequados
-----------	-----------

Comentários sobre os Objetivos

Pacientes e Métodos	
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total Local
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Crítérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Não apresentada
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Ausente
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Não se aplica
Termo de Consentimento	Não se aplica
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim

Comentários sobre os Itens de Pacientes e Métodos

Cronograma	Comentário
Data de início prevista	
Data de término prevista	
Orçamento	Adequado
Fonte de financiamento externa	Não

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento

Referências Bibliográficas	Adequadas
----------------------------	-----------

Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

O presente trabalho apresenta grande relevância clínica e seus resultados poderão contribuir em muito para o tratamento das afecções pulpares de grande ocorrência na população.

Página 2-2


Bárbara Lima Simioni Leite
Coord. Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade Tiradentes

Anexo II: Parecer do Comitê de Ética da Faculdade Pio Décimo

**FACULDADE
PIO DÉCIMO**
Associação de Ensino e Cultura "Pio Décimo"
Reconhecida pelo Decreto N° 8.5.064 de 22.03.79

www.piodecimo.com.br

MEMORANDO n° 02/09 Aracaju, SE, 18 de Agosto de 2009

À Senhora
Daisy Pereira Valido

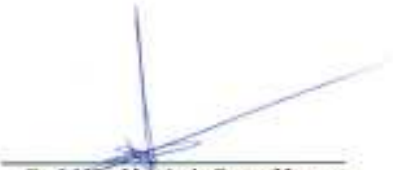
De: Comissão de Ética e Bem-estar Animal Pio X.

Assunto: Projeto de pesquisa UNIT

Prezada Senhora

A Comissão de Ética e Bem-estar Animal da Faculdade Pio Décimo vem através deste documento **DEFERIR** o processo referente ao projeto encaminhado para avaliação intitulado "*Utilização de otólitos em polepas dentais de cães pós-pulpotomia: um estudo comparativo*". A partir desse momento, a Sra. Daisy Pereira Valido ficará na responsabilidade de entregar à Comissão a ficha de adoção dos animais utilizados no experimento.

Atenciosamente,


Prof. MSc. Marcio de Castro Meneses
Médico Veterinário
Membro da Comissão de Ética- Faculdade Pio X
Prof. MSc. Marcio C. Meneses
CRMV-SE 2542

Anexo III: Solicitação para cessão dos cães ao Secretário Municipal de Saúde

Exmo Sr. Dr. MARCOS RAMOS CARVALHO,
Secretário Municipal de Saúde

Eu, Daisy Pereira Valido, brasileira, casada, maior capaz, servidora pública federal, cirurgiã-dentista, portadora da cédula de identidade 575.255 SSP-SE, CPF 42382394587, título de eleitor 156.20.21.51, estudante do curso de mestrado em Saúde e Ambiente da Universidade Tiradentes, venho, por meio deste, solicitar a cessão de 02 (dois) cães do Centro de Controle de Zoonoses de Aracaju como modelo experimental, para a realização do experimento da minha tese de mestrado, que tem como tema de dissertação a "UTILIZAÇÃO DE OTÓLITOS EM POLPAS DENTAIS DE CÃES PÓS-PULPOTOMIA: UM ESTUDO EXPERIMENTAL COMPARATIVO", cujo projeto de pesquisa encontra-se aprovado pelo comitê de ética da Universidade Tiradentes, conforme projeto e parecer em anexos. Em tempo, informo que a realização do experimento dar-se-á em parceria com a Faculdade Pio Décimo, sob a supervisão de médico veterinário.

Nestes termos, aguardo deferimento,

Aracaju, 16 de julho de 2009

Daisy Pereira Valido
Daisy Pereira Valido

Endereço: Av. Beira Mar, 1820, apto 701
Bairro: Jardins
Aracaju – SE
CEP 49025-040

Email: daisy@infonet.com.br
Telefone: 79 99825959/ 32462633

Eleni
Eleni Dias da Cruz
Assistente de Gabinete
SMS / Aracaju - SE
17-07-09

2106-9711
Eleni

Anexo IV: Solicitação à Faculdade Pio Décimo de parceria no financiamento da pesquisa

Exmo Sr. Prof. JOSÉ SEBASTIÃO DOS SANTOS,
Diretor Geral da Faculdade Pio Décimo

Eu, Daisy Pereira Valido, brasileira, casada, maior capaz, servidora pública federal, cirurgiã-dentista, portadora da cédula de identidade 575.255 SSP-SE, CPF 42382394587, título de eleitor 156.20.21.51, estudante do curso de mestrado em Saúde e Ambiente da Universidade Tiradentes, venho, por meio deste, solicitar a autorização e a parceria da Faculdade Pio Décimo para a utilização do seu Hospital Veterinário na realização do experimento da minha tese de mestrado, no qual serão utilizados 02 (dois) cães provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Aracaju como modelo experimental e que tem como tema de dissertação a "UTILIZAÇÃO DE OTÓLITOS EM POLPAS DENTAIS DE CÃES PÓS-PULPOTOMIA: UM ESTUDO EXPERIMENTAL COMPARATIVO", cujo projeto de pesquisa encontra-se aprovado pelo comitê de ética da Universidade Tiradentes e em análise pela Comissão de Ética e Bem-estar Animal da Faculdade Pio Décimo que, de acordo com sua avaliação prévia, determinou a revalidação de alguns itens referentes à metodologia a ser aplicada, dentre eles a quarentena dos animais para que os mesmos fiquem em condições ideais de saúde e realizem exames (hemograma, uréia, creatinina, função hepática, urinálise, plaquetas e exame de fezes), de modo a garantir que os resultados da pesquisa não sejam alterados pelas condições de saúde/doença do animal. Após a quarentena, os cães, sob anestesia geral, serão submetidos à profilaxia, limpeza de tártaro e alisamento manual, ao isolamento absoluto do campo operatório com dique de borracha, exposição padronizada da polpa de dentes hígidos, proteção pulpar com os materiais capeadores a serem testados e ao selamento das cavidades com restauração de ionômero de vidro fotopolimerizável. Os animais, após concluída a parte experimental, serão mantidos em cativeiros individualizados por até 30 dias, com alimentação pastosa e água à vontade. Após 15 e 30 dias, os animais 1 e 2 respectivamente, serão anestesiados, os incisivos extraídos e as peças serão processadas, no laboratório de patologia da UNIT, para a análise microscópica dos dentes e observação histomorfológica da barreira

Daisy

dentinária formada. Tendo em vista a quarentena, os 31 dias para a realização do experimento, o período de recuperação pós-operatório dos animais, os exames necessários, o porte anestésico e o uso das instalações do centro cirúrgico, solicito a parceria da Faculdade Pio Décimo nos gastos necessários para a realização do experimento. Em tempo, informo que o experimento dar-se-á sob a supervisão dos professores do curso de Medicina Veterinária da Faculdade Pio Décimo e com o acompanhamento clínico dos animais pela médica veterinária Suelem Mendes da Mota Bravo, ex-aluna do curso de medicina veterinária dessa Faculdade.

Nestes termos, aguardo deferimento,

Aracaju, 6 de agosto de 2009


Daisy/Pereira Valido

Endereço: Praça Tobias Barreto, 510, sala 207, Centro Médico Odontológico
Bairro: São José
Aracaju – SE
CEP 49015-150

Email: daisy@infonet.com.br
Telefone: 79 99825959/ 32462633

Anexo V: Extração dos otólitos/trituração/diluição em 100ml de água destilada para aferir pH



Anexo VI: Resultado da aferição do pH



Anexo VII: Esterilizadora



Anexo VIII: Radiopacidade do otólito



Anexo IX: Cavity oral canina



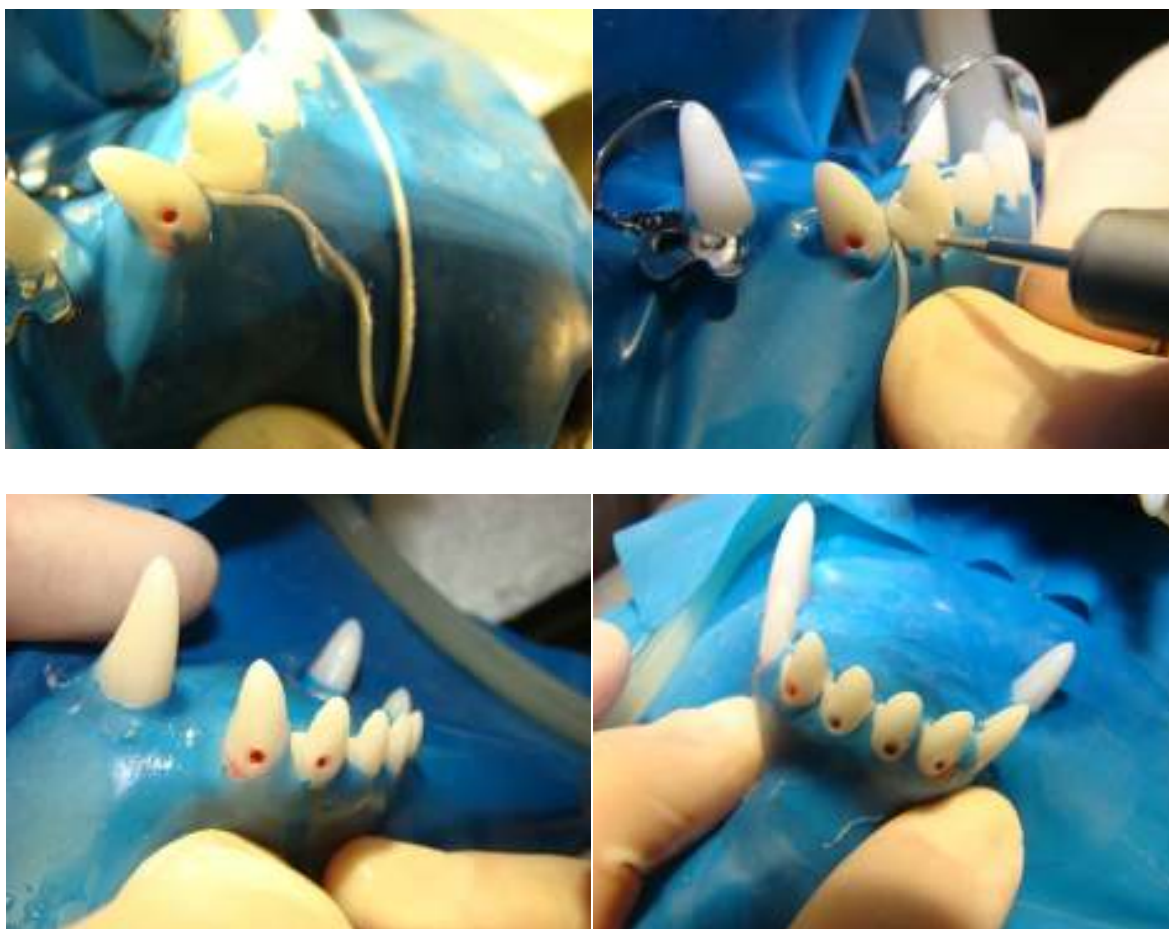
Anexo X: Profilaxia oral



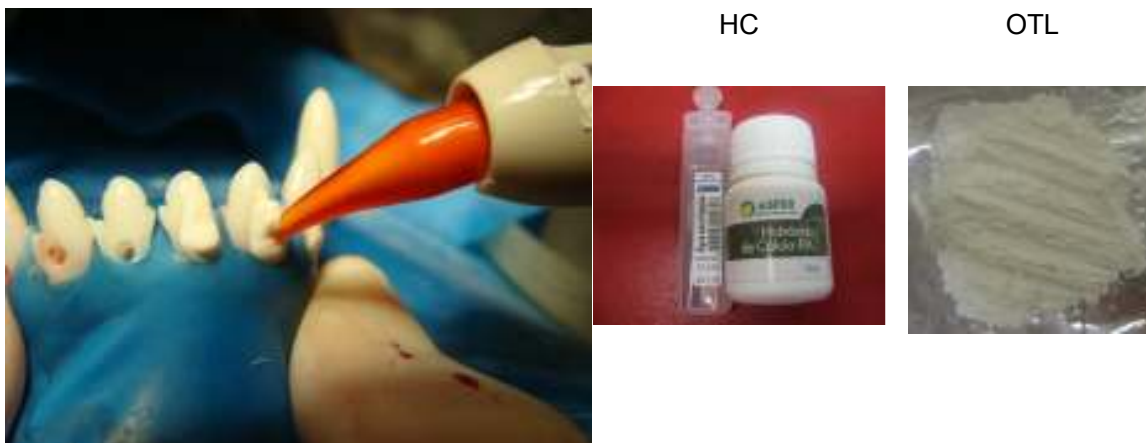
Anexo XI: Isolamento absoluto da cavidade por arcada



Anexo XII: Preparos cavitários padronizados/Sangramento pulpar



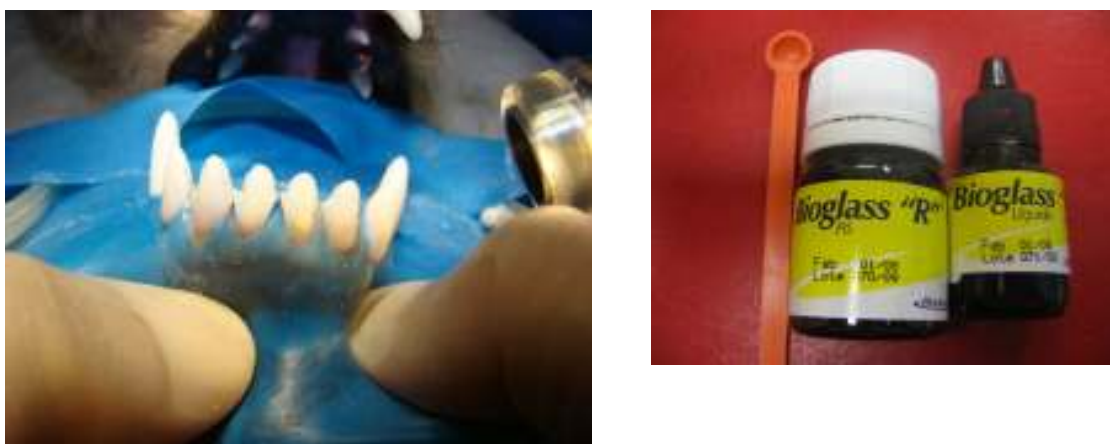
Anexo XIII: Inserção do material de proteção pulpar na cavidade/Material protetor



Anexo XIV: Remoção do excesso do material protetor



Anexo XV: Selamento cavitário com ionômero de vidro



Anexo XVI: Extração do dentes para análise morfométrica



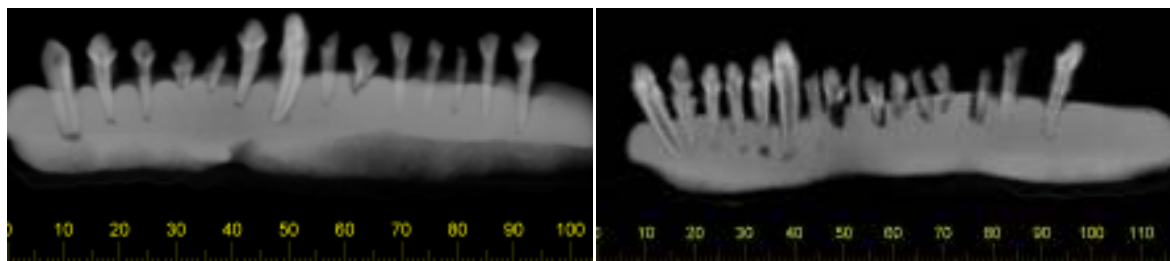
Anexo XVII: Dentes extraídos



Anexo XVIII: Dentes extraídos montados no elastômero para tomografia



Anexo XIX: Tomografia das arcadas



Anexo XX: Imagem tomográfica comprovando ausência ou presença de barreira mineralizada

Grupo I: HC – 21 dias

Grupo II: OTL – 21 dias

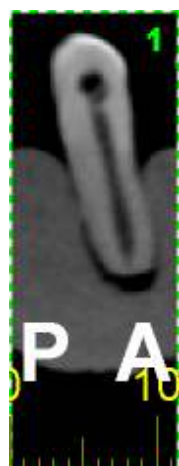
Grupo III: CTR – 21 dias



Grupo I: HC – 30 dias

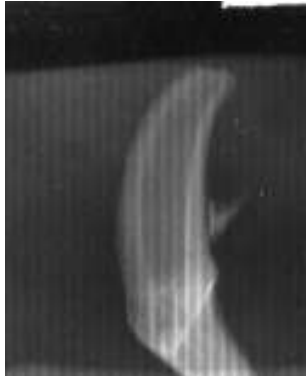
Grupo II: OTL – 30 dias

Grupo III: CTR – 30 dias

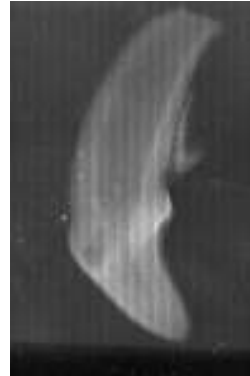


Anexo XXI: Imagem radiográfica de espécimes após conclusão do experimento

Grupo I: HC – 21 dias



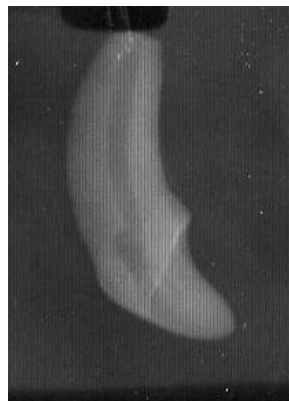
Grupo II: OTL – 21 dias



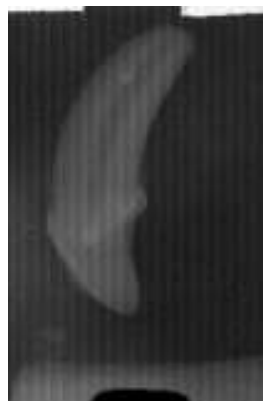
Grupo III: CTR – 21 dias



Grupo I: HC – 30 dias



Grupo II: OTL – 30 dias



Grupo III: CTR – 30 dias



Anexo XXII: Visualização macroscópica de barreira mineralizada

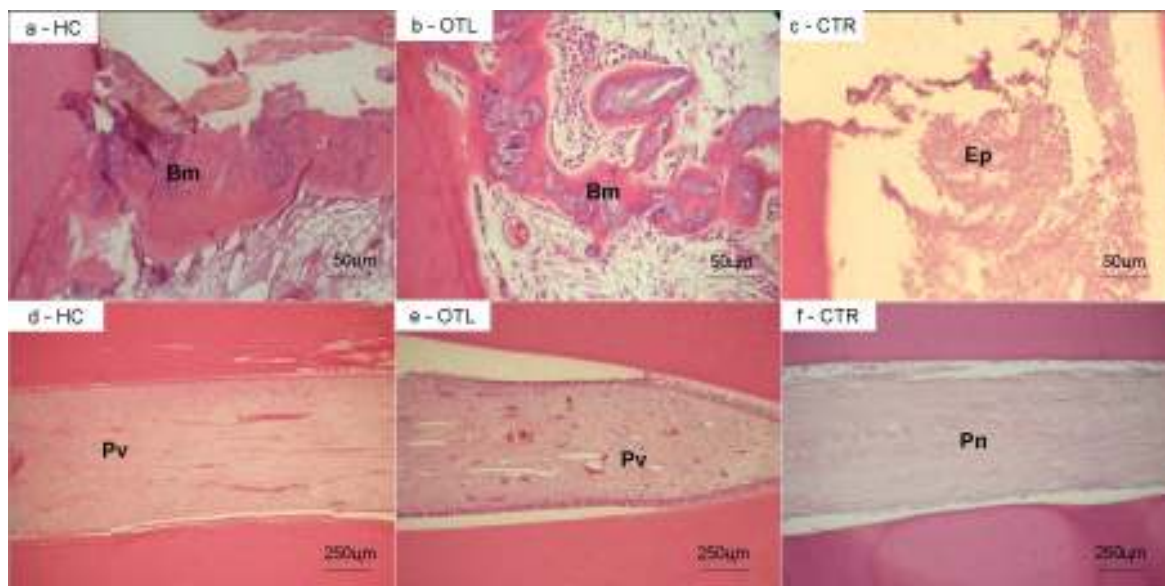
Material Protetor: HC



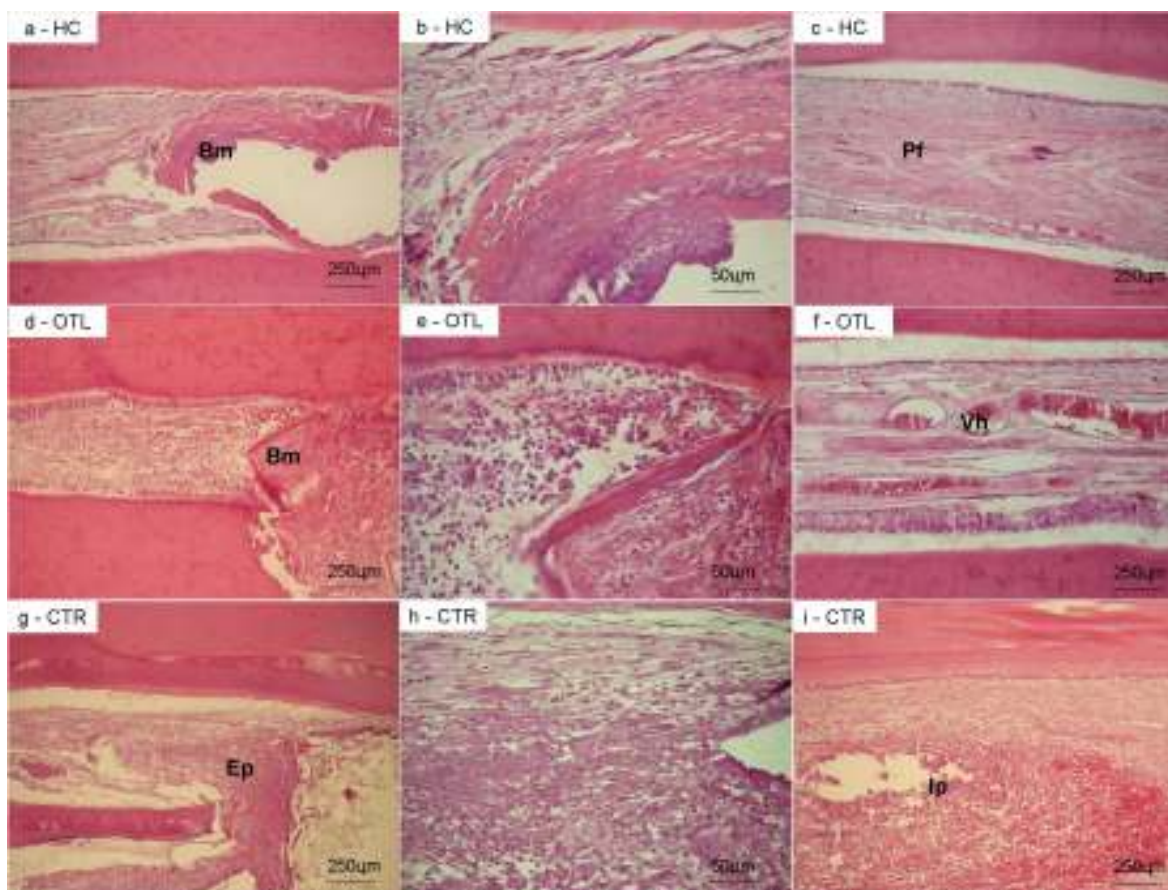
Material Protetor: OTL



Anexo XXIII: Achados anatomopatológicos após 21 dias do experimento



Anexo XXIV: Achados anatomopatológicos após 30 dias do experimento



CAPÍTULO II

ARTIGO CIENTÍFICO

A novel promising natural product for direct dental pulp capping based on Cynoscion acoupa otoliths: experimental study in canine model.

Daisy Pereira Valido¹; Daniel Campos Souza²; Felipe Góes Prado²; Sheyla Alves Rodrigues³; Allan Ulisses Carvalho de Melo⁴; Antonio Roberto de Oliveira Ramalho⁵; Márcio de Castro Menezes⁶; Sonia Oliveira Lima⁷; Lauro Xavier-Filho⁷; Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque-Júnior⁷

¹ MSc. Post-Graduating Program in Health and Environment. University Tiradentes, Aracaju/SE, Brazil.

² Graduate Student. School of Dentistry, University Tiradentes, Aracaju/SE.

³ MSc. Laboratory of Natural Products and Biotechnology, Science and Technology Institute, Aracaju/SE, Brazil.

⁴ PhD. School of Dentistry, University Tiradentes, Aracaju/SE.

⁵ MSc. Laboratory of Morphology and Structural Biology, Science and Technology Institute, Aracaju/SE, Brazil.

⁶ PhD. School of Veterinary Medicine, Pio Décimo Faculty, Aracaju/SE, Brazil.

⁷ PhD. Post-Graduating Program in Health and Environment. University Tiradentes, Aracaju/SE, Brazil.

Corresponding author

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior

Av. Murilo Dantas, 300, Bairro Farolândia, CEP 49032-490. Aracaju/SE, Brazil.

Phone: +557932182190, e-mail: ricardo.patologia@uol.com.br

A novel promising natural product for direct dental pulp capping based on Cynoscion acoupa otoliths: experimental study in canine model.

ABSTRACT:

Direct pulp capping is a procedure that comprises adequate protection of the pulp tissue exposed to the oral environment, in order to seal this spot against bacterial leakage, and preserve the pulp vitality as well as its nutritional, sensory, protection and formation of tissue barrier mineralized functions. Otoliths are calcareous concretions found in the inner ear of bony fishes, constituted of a wide range of inorganic compounds and high-molecular weight collagenous proteins apparently related to the human hard tissues calcification process. This study evaluated the response of the dental pulps of dog teeth to capping with otolith, calcium hydroxide or sealed glass ionomer cement. Therefore, two dogs were anesthetized and, after placement of a rubber dam, the dental pulps the incisors were experimentally exposed. Subsequently, the teeth were assigned into three groups, according to the capping material employed: otoliths preparation (OTL) and calcium hydroxide (HC); no protective material was used in the third group (CTR). The cavities were then sealed with glass ionomer cement. Twenty-one and 30 days after the experiment, the animals were anesthetized, the teeth were extracted and subjected to cone-beam computerized tomography, X-rayed and prepared for histomorphological analysis. The otoliths showed biocompatibility with the pulp tissue *in vivo* and the response of pulp tissue in OTL was similar to those produced in HC. Besides, mineralized barrier with dentin-like appearance was observed in 100% HC, whereas 83.3% of OTL formed an osteoid barrier sealing the spot area. No hard tissue formation was seen in CTR either in 21 or in 30 days. There was no statistically significant difference between OTL and HC ($p < 0.05$). We concluded that the otoliths stimulates the formation of mineralized tissue barrier and inducing the reparative pulp response, and hence work as a promising pulp capping material.

DESCRIPTORS: Otoliths. Dental pulp capping. Biocompatible Materials. Calcium hydroxide. Dental pulp cavity.

1. Introduction

Recently, many studies have been performed in attempt to improve bone regeneration by using acellular or cellular implantable materials¹¹. Biominerals are an alternative class of biomaterials able to induce or improve bone formation in substitution to the autogenic grafts when applied into large bone defects^{2, 25}. They consist of an inorganic phase (or phases) (usually simple salts or oxides) and a range of biomolecules that are often proteins, but may be carbohydrates, lipids or low-molecular-weight (<1 kDa) molecules such as polyamines. These biominerals are widely formed by bacteria, single-celled protists, plants, invertebrates and vertebrates including humankind²².

The use of natural products with biomineral physical-chemical features has been target of a wide range of investigations in the bioengineering field, particularly aiming at improving the biomineralization process based on calcium carbonate²¹. The *Cynoscion acoupa* (Weakfish, specie of the *Sciaenidae* family) is an important world fishing resource, presenting about 70 genders and 270 species widely found in Atlantic, Pacific and Indic oceans. It is found mainly in marine and estuary coast waters. In South America, it is concentrated in tropical and subtropical waters from the Brazilian coast, along all the coastal zone¹⁵.

Among the hard structures of the *Cynoscion acoupa*, it is possible to highlight the otoliths, a calcarian compound observed in the inner ear of bony fishes. Otoliths are crystalline structures, comprised primarily of calcium carbonate, located in the inner ear of bony fishes, which function as balance organ^{5,9}. Studies have indicated that otoliths are rich in calcium carbonate, metallic elements (Sr, Ba, Mg, Cd, Co, Cu, Zn, Na, K) and non-metallic compounds (Si, P, S, B)⁴, as well as in a high molecular weight collagenous protein called otolin-1 and otoliths protein matrix-1^{18,19,20,27}, added to carbohydrates and lipids⁶. Therefore, despite otolith applications strayed so far across taxonomic and methodological boundaries, due to its chemical composition it is possible to suppose that this material might work as a biomineral.

Otolin-1 is a high molecular weight protein whose C-terminal domains present homology with type VIII and X collagen ones^{18,20}, proteins closely related to the mineralization process of non-calcified matrices²⁶. It has been suggested that this otoliths protein represent a site of calcium carbonate (CaCO₃) deposition^{18,24} and hence facilitate the calcification process, just as occurs in bone and dentin by using calcium phosphate (CaPO₄)^{2,18}.

Due to the high incidence and prevalence of caries disease, the damage of the dental organ for carious processes may sometimes lead to dental pulp exposition, as a result of the carie-related desmineralization dynamics itself or during the dentistry operative procedures¹⁷. It is well-established that depending on the inflammation grade of the dental pulp, it is possible that this specialized connective tissue recovers in response to conservative procedures, by means of the formation of mineralized barrier to seal the exposition²⁸.

Therefore, the goal of this study was to investigate the role played by otoliths of *Cynoscion acoupa* as biomineral adjuvant in biological assays of mineralized barrier formation in experimentally exposed dental pulps in canine model.

2. Material and methods

2.1 – Obtaining of the otoliths preparation:

The material in this study was prepared with 1 g powder of otolith of *Cynoscion acoupa* with particle size 60 mesh and addition 0,25 g of hydrolyzed collagen, diluted in distilled water. The final product was packaged in dishes Petri and sterilized in UV rays (25 min). Subsequently, 1.0 g of the otoliths was diluted in 100 mL of distilled water, and the pH of the compound was assessed by using phmetro Digimed® (São Paulo, SP, Brazil) according to the manufacturer instructions.

2.2 - Operative procedures

The superior and inferior incisors of two mongrel dogs (male gender; age: 12-36 months; weight: 10-13 Kg), totaling 24 teeth, were selected for treatment. The specimens were identified to 1 until 12 for each animal. Therefore, the animals were pre-anesthetized with acepromazine (0.1 mg/Kg) (Acepran®, Univet Indústria Veterinária S.A., Campo Grande, MS, Brazil) and tramadol (2.0 mg/Kg) (Ultracet®, JANSSEN-CILAG Farmacêutica Ltda., São José dos Campos, SP, Brazil). The anesthesia was obtained by using propofol (5.0 mg/kg EV) (Diprivan®, Astra Zeneca do Brasil Ltda., Cotia, SP, Brazil) and maintained with isoflurano® (Instituto BioQuímico Indústria Farmacêutica Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brazil) solution diluted in oxygen 100%. Local complementary infiltrate anesthesia was also performed with 1.0 mL lidocaine hydrochloride (Xylestesin®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brazil).

Crowns were cleaned, a rubber dam was placed and antiseptis with 2% chlorhexidine was performed. Coronal access on the buccal surface was performed with

high-speed nº1012 spherical diamond burs with cooling (Vortex® Indústria e Comércio de Ferramentas Diamantadas Ltda, São Paulo, SP, Brazil), under refrigeration. After new antisepsis, the pulp chamber was exposed, and the homeostasis and dentine chip removal was obtained by irrigation of the pulp with saline solution. The dental pulp health status after the operative procedures was evaluated by visual (hot red color), tactile (firm texture) analysis, and spontaneous bleeding.

The pulp tissue was covered, aided for syringe Centrix® (Copyright © DFL Indústria e Comércio S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brazil), with either otoliths preparation (OTL, 06 teeth/animal – specimens 4, 5, 6, 7, 8 e 9) or calcium hydroxide p.a. paste (Asfer Indústria Química Ltda., São Caetano do Sul, SP, Brazil) mixed with distilled water (HC, 03 teeth/animal – specimens 1, 2 e 3). In six teeth (03 teeth/animal – specimens 10, 11 e 12), the pulps remained uncovered, so that they might work as negative control (CTR). In the three groups, the teeth were restored with glass ionomer cement (Bioglass R®, Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda., Ibioporã, PR, Brazil), without previous acid conditioning. All the commercial products employed in this study were manipulated according to the manufacturer instructions. Twenty-one and 30 days after the operative procedures, the teeth were extracted and fixed in buffered formalin (pH 7.4). Euthanasia of the animals was not required and they were sent to adoption. The animals received post-operative medication with meloxicam (Movatec®, Boehringer Ingelheim do Brasil Química e Farmacêutica LTDA., Itapeverica da Serra, SP, Brazil) (0.1 mg/Kg, 24/24 h) and tramadol (2.0 mg/Kg, 8/8 h), for seven days.

2.3 - Imaginological study

The radiographic study was performed in a Dabi Atlante (Ribeirão Preto, SP, Brazil) Apparatus (70kVp, 8 mA), focal distance of 20 cm, and exposition time corresponding to 0.5 s, by using periapical films Ultra-speed D® (Eastman kodak Company, Rochester, New York, USA) and positioner Rinn® (Rinn Corporations, Elgin, Illinois, USA).

The computed tomographic study was performed with Dento-Maxillofacial Limited Cone-beam Super High Resolution CT (i-CAT Imaging Sciences Internacional®, USA). The size of imaging volume was a cylinder with diameter 40 X height 30 mm at the X-ray rotational center. Images were taken under the exposure condition of 80 kV (X-ray tube voltage) and 4 mA (X-ray tube electric current), which were the standard parameters and can be changed for different subjects. A small cone-shaped X-ray beam irradiated the

image intensifier with a CCD camera for approximately 40 s while the C-arm made one 360° rotation. The panoramic reconstructions were carried out using software Xoran.

The imaginological analysis was performed considering the parameters absence (-) ou presence (+) of image consistent with mineralized barrier.

2.4 - Histological processing and morphological analysis

The teeth were submitted to demineralization procedures in EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) for 96 h. The teeth were then washed in running water for 24 h, dehydrated by increasing concentrations of ethyl alcohol, cleared in xylol, and embedded in paraffin blocks. Serial 6-µm wide longitudinal sections were stained with hematoxylin and eosin and analyzed in light microscope.

During the histopathological analysis, and the following parameters were evaluated and graded according to a numerical scale: a) intensity of inflammatory infiltrate: grade 0, absent; grade 1, mild; grade 2, moderate; grade 3, severe; b) type of inflammatory infiltrate: acute, subacute or chronic; c) mineralized barrier: grade 0, absent; grade 1, presence of discontinuous barrier; grade 2, presence of continuous barrier. The histopathological analysis was performed by one examiner who was blinded to the group being evaluated.

2.5 - Statistical analysis

The presence and the type of mineralized barrier were compared among the groups by using the Exact Fisher's test. The analysis of the inflammatory infiltrate was carried out by using Kruskal Wallis test. The differences were considered significant when p values were less than 0.05.

3. Results

The pH of the otoliths preparation was 8.77, and the biomaterial proved to be radiopaque.

According to the radiographic evaluation (figure 1a/b/c), in 21 days it was observed the presence of mineralized barrier in 100% of the specimens of HC and OTL, but not in CTR. In the CT analysis (figures 2 and 4), the barrier was visualized in 33.3% of CTR, and 100% of HC and OTL. In 30 days, the mineralized barrier was seen in 100% of HC and, 83.3% of OTL in both CT and radiographic studies (figures 3 and 4). However, although a

radiopaque image compatible with hard tissue radiographically apparent in 66.6% of CTR, this finding was not confirmed by CT scans (table 1).

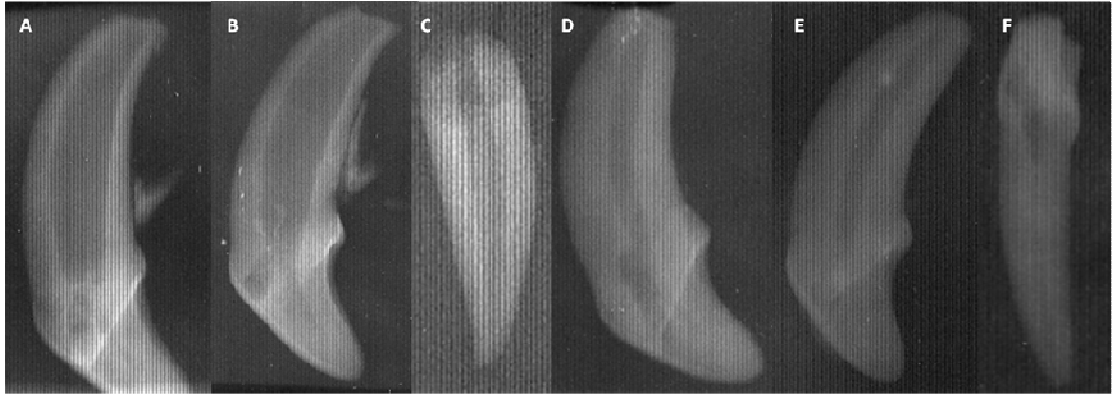


Figure 1. Radiographic appearance of the mineralized barrier in HC (A and D) and OTL (B and E) 21 and 30 days after the operative procedures, respectively. Observe the absence of barrier in CTR (C and F).

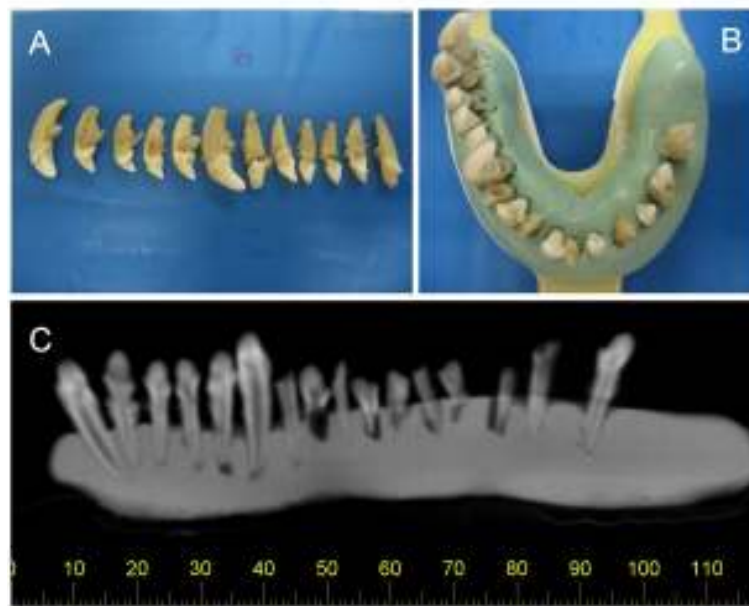


Figure 2. Teeth extracted 21 days after the operative procedures (A), and mounted for the CT scanning (B). Panoramic view of the cone beam CT scan (C).

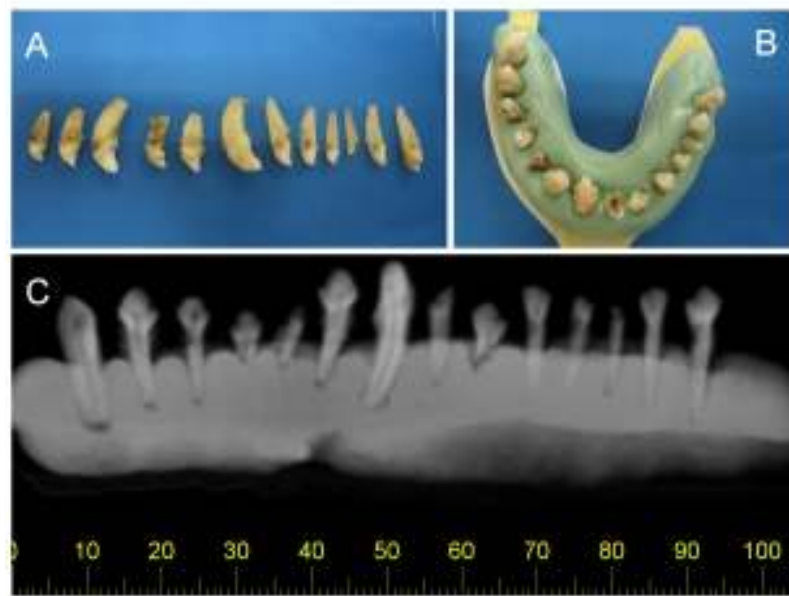


Figure 3. Teeth extracted 30 days after the operative procedures (A), and mounted for the CT scanning (B). Panoramic view of the cone beam CT scan (C).

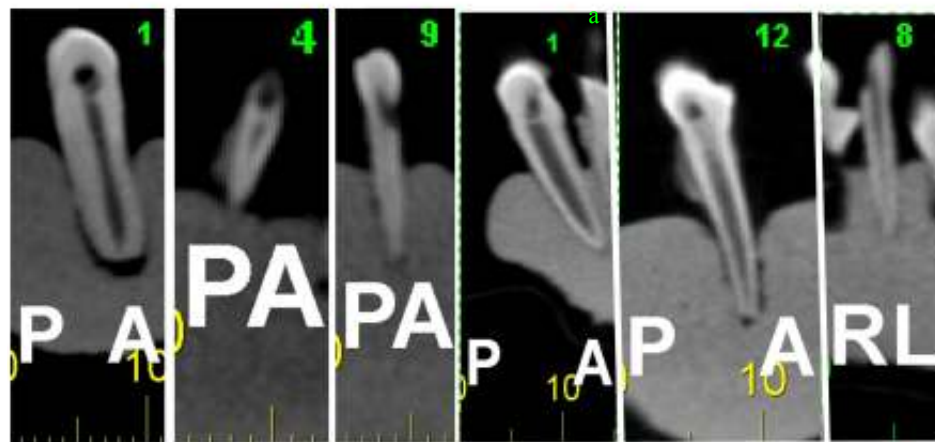


Figure 4. Details of the tomographic images of the mineralized barrier in HC (1) and OTL (4), which is not seen in CTR (9) 21 days after the operative procedures. In 30 days, it is possible to evidence well-formed barrier in HC (1a) and OTL (12), and lack of such structure in CTR (8)

Table 1. Frequency of the presence and absence of mineralized barrier observed in the radiographic and tomographic analysis.

Time	Mineralized barrier	Groups					
		CTR n (%)		HC n (%)		OTL n (%)	
		RA	TA	RA	TA	RA	TA
21days	Present	0 (0)	1 (33.3)	3 (100)	3 (100)	6 (100)	6 (100)
	Absent	3 (100)	2 (66.6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Total	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	6 (100)	6 (100)
30 days	Present	2 (66.6)	0 (0)	3 (100)	3 (100)	5 (83.3)	5 (83.3)
	Absent	1 (33.3)	3 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (16.6)	1 (16.6)
	Total	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	6 (100)	6 (100)

RA: Radiographic analysis; TA: Tomographic analysis.

After hemi-section of the decalcified teeth, it was possible to verify, macroscopically, the presence of hard structure in bridge, consistent with dental mineralized barrier in some specimens of HC and OTL (figure 5), strongly suggesting the success of the experiment.

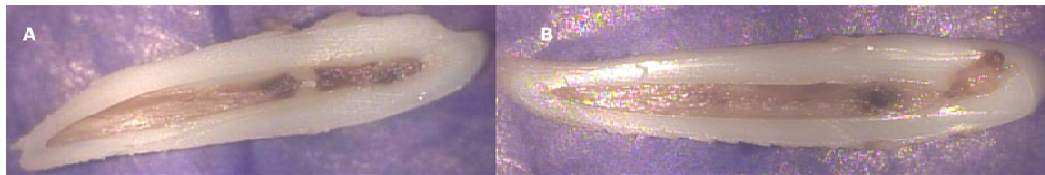


Figure 5. Macroscopic evidence of hard structures in bridge compatible with dental mineralized barrier occluding the pulp exposition zone in tooth capped with HC (A) and OTL (B) 30 days after the operative procedures

Histologically, it was observed the formation of mineralized barrier in all the specimens of HC and 66.6% of OTL 21 days after the operative procedures. In 30 days, all teeth of HC and OTL exhibited mineralized barrier formation. No sample of CTR showed hard tissue formation either in 21 or in 30 days (table 2). There was no statistically significant difference among HC and OTL regarding to the formation and type of deposited barrier ($p>0.05$).

Furthermore, the histological appearance of the barrier was different in those two groups. In HC, it was composed of a homogeneous eosinophilic tissue, with variable thickness, showing no cells within the matrix, mimicking a dentin-like morphology. In the periphery of the hard tissue, ovoid cells disposed in a pseudo-stratified arrangement, resembling odontoblasts, were observed rimming the newly-formed hard tissue. In OTL, on the other hand, there was deposition of thin irregular matrix showing osteoid

appearance, apparently surrounding grossly granular amorphous basophilic nuclei compatible with dystrophic calcification (figures 6 and 7).

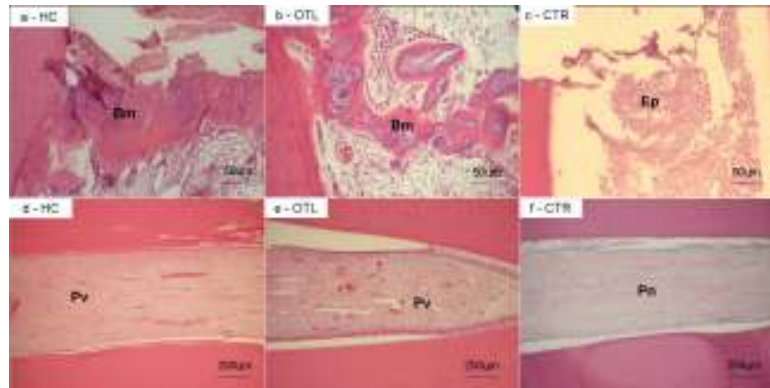


Figure 6. Histological sections stained in HE (21 days). Formation of mineralized barrier (Bm) with dentin-like appearance in HC (a-HC) and resembling osteoid in OTL (a-OTL). No occlusive barrier is seen in CTR in the exposition zone (Ep) (c-CTR). The remaining pulp (middle third) presented conspicuous network of hyperemic capillary blood vessels (Pv) in HC (d-HC) and OTL (e-OTL), whereas in CTR (f-CTR) there was morphological signs of coagulative necrosis (Pn).

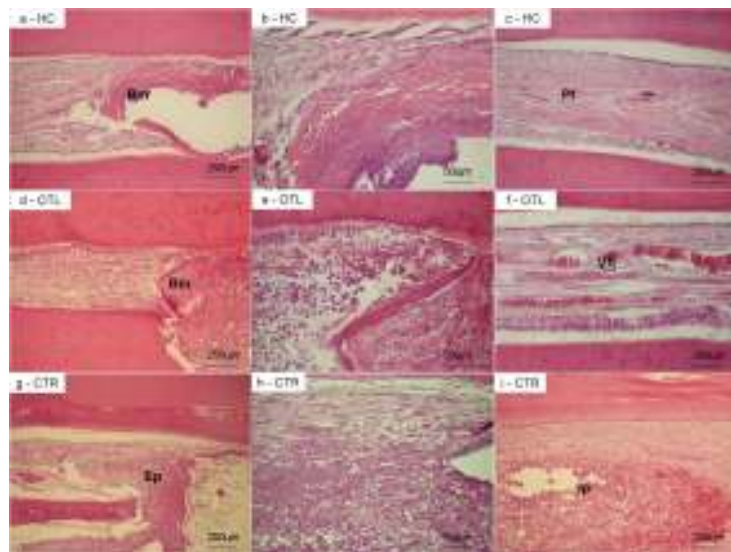


Figure 7. Histological sections stained in HE (30 days). Formation of mineralized barrier (Bm) in HC (a-HC) and OTL (d-OTL), whereas no barrier was seen in the exposition zone (Ep) in CTR (g-CTR). Adjacent to the exposition zone, there was scarce chronic infiltrate in HC (b-HC), but moderate in OTL (e-OTL). In CTR (h-CTR), there was intense acute infiltrate. In the remaining pulp middle third, it was observed fibrosis (Pf) in HC (c-HC), high content of hyperemic blood vessels (Vh) in OTL (f-OTL), and prominent acute infiltration (Ip), sometimes presenting microabscesses, in CTR (i-CTR).

Table 2. Frequency of the presence and type of mineralized barrier observed in the histological analysis.

Time	Mineralized barrier	Groups		
		CTR n (%)	HC n (%)	OTL n (%)
21days	Continuous	0 (0)	2 (66.6)	2 (33.3)
	Discontinuous	0 (0)	1 (33.3)	2 (33.3)
	Absent	3 (100)	0 (0)	2 (33.3)
	Total	3 (100)	3 (100)	6 (100)
30 days	Continuous	0 (0)	2 (66.6)	3 (50)
	Discontinuous	0 (0)	1 (33.3)	3 (50)
	Absent	3 (100)	0 (0)	0 (0)
	Total	3 (100)	3 (100)	6 (100)

The analysis of the inflammatory infiltrate showed that, in general, the severity of the inflammation tended to be more expressive in the cervical zone, reducing substantially in the middle and apical thirds. In 21 days, the pattern of inflammation was similar among the groups. In the cervical pulp thirds, the inflammatory severity ranged from moderate to intense, whereas in the middle and apical thirds, it varied between mild and absent. In 30 days, there was a slight decrease in the severity of the inflammation in the cervical pulp third in HC, although it appeared to increase in CTR and OTL. In the middle and apical pulp thirds the inflammatory profile remained mild or absent in HC and OTL. However, in CTR, necrosis was verified in two samples of 21 days, and in one sample of 30 days (table 3). There was no significant difference among the groups concerning the inflammatory infiltrate ($p>0.05$).

Table 3. Semiquantitative analysis of the inflammatory infiltrate observed in the dental pulp of the teeth used in the experiment.

Time	Pulp third	Groups											
		CTR			HC			OTL					
21days	Cervical	2*	n	2	3*	3*	2	2	2	2*	2	3*	2
	Middle	n	n	2	3	2	0	1	1	0	0	2	1
	Apical	n	n	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30 days	Cervical	2*	3*	n	2*	2	2	1	3*	3*	2	3*	3*
	Middle	2	3	n	1	1	1	0	2	1	1	1	2
	Apical	2	0	n	0	0	0	0	0	1	1	0	0

(3) Intense infiltrate; (2) moderate infiltrate; (1) mild infiltrate; (0) absent; (n) pulp necrosis; (*) acute neutrophils-rich infiltrate.

When the presence or absence of mineralized barrier confirmed by histological analysis was compared to the radiographic and tomographic visualization of such mineralized structure, there was a coincidence percentage of 79.16% and 87.5%, respectively, as demonstrated in the table 4.

Table 4. Comparative study of the coincidence of the imaginological and histological diagnosis methods for the identification of mineralized barrier in the experimental and control groups.

Experimental period	Diagnosis method	Specimens											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
21 days	RA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	TA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	HA	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
30 days	RA	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
	TA	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	HA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

RA – radiographic analysis; TA – tomographic analysis; HA – histological analysis.

4. Discussion

In humans, the biological effect of pulp protection materials is evaluated fundamentally by the response of the pulp tissue and formation mineralized tissue occluding the exposition zone.

In this study, calcium hydroxide was used as positive control due to its biological properties (biocompatibility, antimicrobial activity, and ability to induce the deposition of newly formed mineralized barrier)^{7,8,16,23}, and capability of sustaining the vitality of the dental pulp^{1,12,13,16,17,28}. Notwithstanding, this product initially causes chemical lesion induced by the release of hydroxyls, leading to superficial necrosis of the pulp tissue. If

the pulp is not protected by a suitable marginal sealing, the formation of mineralized barrier may be unsuccessful^{3,14,28}. The use of calcium hydroxide induced the formation of mineralized barrier in all the samples of this study, irrespective the experimental period. Similar findings were reported in previous investigations^{1,13}, attesting the efficacy of this product as pulp protective material.

It has been demonstrated that the chemical composition of the otoliths, represented by the high content of CaCO_3 fixed in an organic matrix constituted of high molecular weight collagenous proteins (otolin-1 and otoliths matrix protein -1), could provide a possible biological activity associated to the mineralization of bone and dentin tissues^{18,29}. Therefore, in the current study, the role played by otoliths extracted from *Cynoscion acoupa* in the process of mineralized barrier in dental pulps experimentally exposed of dogs was assessed.

According to our results, otoliths preparation proved to be successful in stimulating the formation of hard tissue barrier, and there was no significant difference regarding its biological activity. Nevertheless, the mechanism responsible for this success is still unknown. It has been suggested that the otoliths mineralization process is closely related to the participation of collagen molecules, similarly to that mechanism of bone and dentin calcification²⁶. Furthermore, it has been demonstrated that the protein otolin-1 found in otoliths presents high homology with type VIII and type X collagen, molecules involved in the mineralization of non calcified protein matrices⁹. Also, otoliths are rich in CaCO_3 and other inorganic constituents associated to the mineralization dynamics⁴. Hence, it is possible that otolin-1 works as nucleation site for calcium deposition and then facilitate the calcification process using CaCO_3 just like collagen molecules propitiate the mineralization of bone and dentin using CaPO_4 ¹⁸. The histological observation of osteoid formation surrounding basophilic nuclei resembling dystrophic calcification seems to support this theory. In addition, the otoliths alkaline pH (8.77) might also interfere in the hard tissue barrier formation, since it is in between the ideal range for alkaline phosphates activation (8.6 – 10.3)⁷. Notwithstanding, further studies are required to clarify the role played by otoliths in the process of pulp mineralized barrier.

Mild to moderate inflammatory reaction was observed in HC and OTL, in opposition to some previous reports, asserting that calcium hydroxide does not induce pulp inflammatory response^{10,12,13,23}. However, it is well-established in the literature that this pulp capping material releases OH ions in the pulp tissue, a highly toxic free radical. Besides, the contact of calcium hydroxide with the pulp connective tissue is supposed to

produce areas of superficial necrosis^{7,8,16}. As long as necrotic tissues and free radicals work as irritant agents, the presence of an inflammatory response is quite expected. Besides, the low magnitude of this response is suggestive that no major damage capable to interfere negatively in the regenerative potential of the pulp tissue has occurred.

Despite the suitable results observed in this study, it must be remembered that the otoliths preparation was used in healthy dental pulp. Therefore, further investigations are required in order to find if the same positive responses will be observed in previously infected and inflamed dental pulp.

The identification of mineralized barrier could be accomplished either by radiographic examination or by volumetric cone beam computed tomography, but the latter showed the highest coincidence result index with the histological findings. The effectiveness of cone beam CT has been suggested in recent studies³⁰. Furthermore, these data seem to suggest that, given the impossibility of histology, computed tomography with cone beam technology appears to represent a more secure and reliable method for studying the formation of mineralized barrier in dental pulp than the radiological assessment.

5 - Conclusions:

In conclusion, we found that the otoliths preparation is biocompatible and capable to induce the formation of mineralized barrier in pulp similarly to calcium hydroxide. Besides, this work represents an innovative contribution in dental research and it also represents the first report regarding the applicability of otoliths as a quite promising biomaterial to be employed in dentistry. However, further research should be conducted in search of new otoliths formulations for dental direct capping, containing antibiotics, anti-inflammatory and corticosteroids in order to achieve a better performance of this product.

6 - References:

1. ALBUQUERQUE DS, GOMINHO LF, SANTOS RA. Histologic evaluation of pulpotomy performed with ethyl-cyanoacrylate and calcium hydroxide. *Braz Oral Res.* 2006;20(3):226-30.
2. BORELLI G, MAYER-GOSTAN N, MERLE PL, DE PONTUAL H, BOEUF G, ALLEMAND D, et al. Composition of biomineral organic matrices with a special emphasis on turbot (*Psetta maxima*) otolith and endolymph. *Calcif Tissue Int.* 2003;72(6):717-725.
3. BRISO ALF, RAHAL V, MESTRENER SR, DEZAN-JUNIOR E. Biological response of pulps submitted to different capping materials. *Braz Oral Res.* 2006;20(3):219-25.
4. CAMPANA SE, NEILSON JD. Microstructure of fish otoliths. *Can J Fish Aquat Sci.* 1985;42(5):1014-1032.
5. CAMPANA SE, THORROLD SR. Otoliths, increments and elements: keys to a comprehensive understanding of fish populations? *Can J Fish Aquat Sci.* 2001;58(1):30-8.
6. DEGENS ET, DEUSER WG, HAEDRICH RL. Molecular structure and composition of fish otoliths. *Marine Biol.* 1969;2(2):105-13.
7. ESTRELA C; HOLLAND, R. Calcium hydroxide: study based on scientific evidences. *J Appl Oral Sci.* 2003;11(4):269-82.
8. ESTRELA C, SYDNEY G.B, BAMMANN LL, FELIPPE JÚNIOR O. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J.* 1995;6(2):85-90.
9. FALINI G, FERMANI S, VANZO S, MILETIC M, ZAFFINO G. Influence on the formation of aragonite or vaterite by otolith macromolecules. *Eur J Inorg Chem.* 2005;162-7.
10. FARACO JÚNIOR IM, 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.

11. FINKEMEIER CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. J Bone Joint Surg. 2002;84(3):454-65.
12. HOLLAND R, MELLO W, NERY MJ, SOUZA V, BERNABE PF, OTOBONI FILHO JA. Healing process of Dog's dental pulp after pulpotomy and pulp covering with calcium hydroxide in powder or paste form. Acta Odontol Pediatr. 1981;2(2):47-51.
13. HOLLAND R, SOUZA V, MURATA SS. Conservative pulp therapy. Revista Ciências Odontológicas. 2006;9(9):25-41.
14. MARION JJC, BORLINA SC, ANJOS NETO DA, MURATA SS. Pulpotomia e perspectiva de apicigênese. Relato de caso. Revista Ciências Odontológicas. 2005;8(8):51-6.
15. MATOS IP, LUCENA F. Descrição da pesca da pescada-amarela, *Cynoscion acoupa*, da costa do Pará. Arq Ciên Mar. 2006;39:66-73.
16. MODENA KCS, CASAS-APAYCO LC, ATTA MT, COSTA CAS, HEBLING J, SIPERT CR, NAVARRO MFL, et al. Cytotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials. J Appl Oral Sci. 2009;17(6):544-54.
17. MONDELLI J. Proteção do complexo dentino-pulpar. São Paulo: Artes Médicas; 1998.
18. MURAYAMA E, TAKAGI Y, OHIRA T, DAVIS JG, GREENE MI, NAGASAWA H. Fish otolith contains a unique structural protein, otolin-1. Eur J Biochem. 2002;269(2):688-96.
19. MURAYAMA E, HERBOMEL P, KAWAKAMI A, TAKEDA H, NAGASAWA H. Otolith matrix proteins OMP-1 and Otolin-1 are necessary for normal otolith growth and their correct anchoring onto the sensory maculae. Mech Dev. 2005;122(6):791-803.
20. MURAYAMA E, TAKAGI Y, NAGASAWA, H. Immunohistochemical localization of two otolith matrix proteins in the otolith and inner ear of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: comparative aspects between the adult inner ear and embryonic otocysts. Histochem Cell Biol. 2004;121(2):155-66.
21. OLSZTA MJ, ODOM DJ, DOUGLAS EP, GOWER LB. A new paradigm for biomineral formation: mineralization via an amorphous liquid-phase precursor process. Connect Tissue Res. 2003;44(1):326-334.

22. PERRY CC, PATWARDHAN SV, DESCHAUME O. From biominerals to biomaterials: the role of biomolecule–mineral interactions. *Biochem Soc Trans.* 2009;37(4):687-91.
23. QUEIROZ AM, ASSED S, LEONARDO MR, NELSON-FILHO P, SILVA LAB. MTA and calcium hydroxide for pulp capping. *J Appl Oral Sci.* 2005;13(2):126-30.
24. ROMANECK CS, GAULDIE RW. A predictive model of otolith growth in fish based on the chemistry of the endolymph. *Comp Biochem Physiol.* 1996;114(1):71-9.
25. SERVICE RF. Tissue engineers build new bone. *Science.* 2000;289(5484):1498 –500.
26. SUTMULLER M, BRUIJN JA, HEER E. Collagen types VIII and X, two non-fibrillar, short-chain collagens. Structure homologies, functions and involvement in pathology. *Histol Histopathol.* 1997;12(2):557-66.
27. TOHSE H, TAKAGI Y, NAGASAWA H. Identification of a novel matrix protein contained in a protein aggregate associated with collagen in fish otoliths. *FEBS J.* 2008;275(10):2512-23.
28. TORRES CRG, CARVALHO JC, VALERA MC, ARAÚJO MAM. Materiais ósseo-indutores para o complexo dentino pulpar. *Pós-Grad. Rev. Fac. Odontol. São José dos Campos.* 2000;3(1):88-96.
29. WIENANDTS P, ARAÚJO FB, VELASCO LEL. Avaliação clínica e radiográfica do MTA como uma alternativa para a proteção pulpar direta em dentes decíduos. *Robrac.* 2002;11(32):54-7.
30. YOUNG SM, LEE JT, HODGES RJ, CHANG TL, ELASHOFF DA, WHITE SC. A comparative study of high-resolution cone beam computed tomography and charge-coupled device sensors for detecting caries. *Dentomaxillofac Radiol.* 2009;38(7):445-451.

ANEXO I



ISSN 1678-7757 printed version
ISSN 1678-7765 online version

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- [Scope and policy](#)
- [Form and preparation of manuscripts](#)
- [Sending of manuscripts](#)

Scope and policy

1 SCOPE

The **Journal of Applied Oral Science** is committed in publishing the scientific and technologic advances achieved by the dental community, according to the quality indicators and peer reviewed material, with the objective of assuring its acceptability at the local, regional, national and international levels. The primary goal of The Journal of Applied Oral Science is to publish the outcomes of original investigations as well as invited case reports and invited reviews in the field of Dentistry and related areas.

2 General Guidelines

2.1 The papers sent for publication must be original and the simultaneous submission to other journal, either national or international, is not allowed. The Journal of Applied Oral Science shall retain the copyright of all papers published, including translations, yet allowing future reproduction as a transcription, provided the source is properly mentioned.

2.2 Only papers written in the English language shall be accepted, and the authors are fully responsible for the texts, citations and references.

2.3 The Journal of Applied Oral Science has the right to submit all manuscripts to the Editorial Board, which is fully authorized to settle the convenience of their acceptance, or return them to the authors with suggestions for modifications in the text and/or for adaptation to the editorial rules of the Journal. In this case, the manuscript will be re-evaluated by the Editor-in-Chief and Editorial Board.

2.4 The concepts stated on the papers published are full responsibility of the authors and do not necessarily reflect the opinion of the Editor-in-Chief and Editorial Board.

2.5 The dates of receipt of the original paper and its acceptance will be indicated in the occasion it is published.

2.6 Each author will receive one copy of the Journal. Additional reprints may be supplied upon request and must be paid by the authors.

2.7 Depending on the financial resources of the Journal of Applied Oral Science or the authors, color illustrations will be published at the discretion of the Editor-in-Chief.

3 Revision Criteria

3.1 Manuscripts will be firstly evaluated regarding presentation according to the instructions for authors. Manuscripts not in accordance with instructions will be rejected and returned to authors without being reviewed by referees.

3.2 Manuscripts in accordance with the instructions will be appreciated in their scientific merit and methods by at least two referees from different institutions of that of the authors, besides the Editor-in-Chief. When revision of the original is

required, the manuscript will be returned to the corresponding author for modification. A revised version with modifications will be re-submitted by the authors, and that will be re-evaluated by the Editor-in-Chief and Editorial Board.

3.3 The Editor-in-Chief will decide upon the acceptance of the manuscript, and may return it to the authors for revision and necessary modifications in the text and/or illustrations. In this case, the authors will be required to re-submit a revised version with the modifications or proper explanations. The revised version will be reviewed by the Editor-in-Chief and Editorial Board.

3.4 Upon approval of the scientific merit, manuscripts will be analyzed regarding the use of proper English grammar (technical review) and statistics. If manuscripts are still considered inadequate, they will be returned to authors for revision.

3.5 Authors and referees will be kept anonymous during the review process.

3.6 Contents of the manuscript are the authors' responsibility and do not reflect the opinion of the Editor-in-Chief or Editorial Board.

4 Galley Proof

4.1 Galley proofs will be sent to the corresponding author by electronic mail in pdf format for final approval.

4.2 Approval of galley proofs by the corresponding author should be returned with corrections, if necessary, within 72 hours.

4.3 If not returned within 72 hours, the Editor-in-Chief will consider the present version the final, and will not allow further modifications. Corrections in the galley proofs should be restricted to minor mistakes that do not modify the content of the manuscript. Major corrections will imply that the manuscript should enter the review process again.

4.4 Inclusion of new authors is not allowed at this phase of the publication process.

Form and preparation of manuscripts

1 Presentation of the Manuscript

1.1 Structure of the manuscript

- Cover page (must be submitted as a supplementary file through the online submission system) which should contain only:
 - Title of the manuscript in English.
 - Names of the authors in direct order with their respective degrees and affiliations in English. Correspondence between International and Brazilian degrees may be obtained at our web page: www.fob.usp.br/jaos.
 - Full address of the corresponding author, to whom all correspondence should be addressed, including fax and phone number as well as e-mail address.

1.2 Text

- Title of the manuscript and subtitle, if necessary, in English.
- Abstract: should comprise at most 300 words, highlighting a little introduction, objective, material and methods, results and conclusions.
- Key words: (words or expressions that identify the contents of the manuscript). The authors are referred to the list of subjects of the "Index Medicus" and DeCS (Health Sciences Descriptors available at <http://decs.bvs.br/>). Authors must use "periods" to separate the key words, which must have the first letter of the first word in capital letters. Ex: Dental implants. Fixed prosthesis. Photoelasticity. Passive fit.
- Introduction: summary of the rationale and proposal of the study including only proper references. It should clearly state the hypothesis of the study.
- Material and Methods: the material and the methods are presented with enough detail to allow confirmation of the findings. Include city, state and country of all manufacturers right after the first appearance of the products, reagents or equipments. Published methods should be referred to and briefly discussed, except if modifications were made. Indicate the statistical methods employed, if applicable. Please refer to item 3 for ethical principals and registration of clinical trials.
- Results: presents the outcomes in a logical sequence in the text, tables and illustrations. Data contained in tables and illustrations should not be repeated in

the text, and only important findings should be highlighted.

- Discussion: this should emphasize the new and important aspects of the study and the resulting conclusions. Any data or information mentioned in the introduction or results should not be repeated. Findings of other important studies should be reported. The authors should point out the implications of their findings as well as their limitations.

- Conclusion(s) (if any)

- Acknowledgments (when appropriate). Acknowledge those who have contributed to the work. Specify sponsors, grants, scholarships and fellowships with respective names and identification numbers.

- References (please refer to item 2.3)

2 TECHNICAL NORMALIZATION

The manuscript should be typed as follows: 1.5 spacing in 11 pt Arial font, with 3-cm margins at each side, on an A4 page, adding up to at most 15 pages, including the illustrations (graphs, photographs, tables, etc). The authors should keep a copy of the manuscript for possible requests.

2.1 Illustrations and Tables

2.1.1 The illustrations (photographs, graphs, drawings, charts, etc.), regarded as figures, should be limited to the least amount possible and should be uploaded in separate files, consecutively numbered with Arabic numbers according to the order they appear in the text.

2.1.2 Photographs should be sent in original colors and digitized in .jpg, tif or gif formats with **10cm width and at least 300dpi**. These illustrations should be provided in supplementary files and **not inserted in the Word document**.

2.1.3 The corresponding legends for figures should be clear, concise and typed at the end of the manuscript as a separate list preceded by the corresponding number.

2.1.4 The tables should be logically arranged, consecutively numbered with Arabic numbers. The legend shall be placed on the top of the tables. Tables should be open in the right and left laterals.

2.1.5 Footnotes should be indicated by asterisks and restricted to the least amount possible.

2.2 Citation of the Authors

Citation of the authors in the text may be performed in two manners:

1) Just numeric: ... and interfere with the bacterial system and tissue system^{3,4,7-10}. References must be cited in a numeric ascending order within the paragraph.

2) or alphanumeric

- one author - Silva²³ (1986)

- two authors - Silva and Carvalho²⁵ (1987)

- three authors - Ferreira, Silva and Martins²⁷ (1987)

- more than three authors- Silva, et al.²⁸ (1988)

Punctuation characters such as "periods" and "commas" must be placed after the numeric citation of the authors. Ex: Ferreira³⁸.

2.3 References

The references must follow the Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals – Vancouver available at:

http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

2.3.1 All references must be cited in the text. They should be **alphabetically ordered** by the last name of the author and numbered in increasing order accordingly. The order of citation in the text should follow these numbers.

Abbreviations of the titles of the international journals cited should follow the Index Medicus/MEDLINE.

2.3.2 Personal communications and unpublished data with no publication date must not be included in the reference list.

2.3.3 Abstracts, monographs, dissertations and theses will not be accepted as references.

2.3.4 The names of all authors should be cited up to 6 authors; in case there are more authors, the 6 first authors should be cited, followed by the expression ", et al.", which must be followed by "period" and should not be written in italics. Ex:

Uhl, et al.

2.3.5 At most 30 references may be cited, except for invited reviews by the Editor-in-Chief.

Examples of references:

Book

Melberg JR, Ripa LW, Leske GS. Fluoride in preventive dentistry: theory and clinical applications. Chicago: Quintessence; 1983.

Book chapter

Verbeeck RMH. Minerals in human enamel and dentin. In: Driessens FCM, Woltgens JHM, editors. Tooth development and caries. Boca Raton : CRC Press; 1986. p.95-152.

Papers published in journals

Wenzel A, Fejerskov O. Validity of diagnosis of questionable caries lesions in occlusal surfaces of extracted third molars. Caries Res. 1992;26:188-93.

Papers with more than 6 authors

The first 6 authors are cited, followed by the expression ", et al."

Parkin DM, Clayton D, Black RJ, Masuyer E, Friedl HP, Ivanov E, et al. Childhood - leukemia in Europe after Chernobyl : 5 years follow-up. Br J Cancer. 1996;73:1006-12.

Papers without authors' names

Seeing nature through the lens of gender. Science. 1993;260:428-9.

Volume with supplement and/or Special Issue

Davidson CL. Advances in glass-ionomer cements. J Appl Oral Sci. 2006;14(sp. Issue):3-9.

Entire issue

Dental Update. Guildford 1991;18(1).

The authors are fully responsible for the correctness of the references.

3 ETHICAL PRINCIPLES AND REGISTRATION OF CLINICAL TRIALS

3.1 Experimental procedures in humans and animals

The Journal of Applied Oral Science reassures the principles incorporated in the Helsinki Declaration and insists that all research involving human beings, in the event of publication in this journal, be conducted in conformity with such principles and others specified in the respective ethics committees of authors' institution. In the case of experiments with animals, such ethical principles must also be followed. When surgical procedures in animals were used, the authors should present, in the Material and Methods section, evidence that the dose of a proper substance was adequate to produce anesthesia during the entire surgical procedure. All experiments conducted in human or animals must accompany a description, in the Material and Methods section, that the study was approved by the respective Ethics Committee of authors' affiliation and provide the number of the protocol approval. The Editor-in-Chief and the Editorial Board reserve the right to refuse manuscripts that show no clear evidence that the methods used were not appropriate for experiments in humans or animals.

3.2 Clinical Trial Registration - International Standard Randomized Controlled Trial Number (ISRCTN)

The Journal of Applied Oral Science supports the policies of the World Health Organization (WHO) and the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) for the registration of clinical trials. The journal recognizes the importance of such initiatives for the registration and international publication of clinical studies with an open access. Therefore, the Journal of Applied Oral Science will publish only those clinical trials that have previously received an identification number, the ISRCTN, validated by the criteria established by the WHO and ICMJE. The WHO defines clinical trials as "any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes. Interventions include but are not restricted to drugs, cells and other biological products, surgical procedures, radiologic procedures, devices, behavioral treatments, process-of-care changes, preventive care, etc".

In order to register a clinical trial, please access one the following addresses:

Register in the **Clinicaltrials.gov**

URL: <http://prsinfo.clinicaltrials.gov/>

Register in the **International Standard Randomized Controlled Trial Number (ISRCTN)**

URL: <http://www.controlled-trials.com/>

4 ANY QUERIES SHALL BE SOLVED BY THE Editor-in-Chief AND EDITORIAL BOARD

Sending of manuscripts

1 MANUSCRIPT SUBMISSION

1.1 Articles must be submitted through the following address

<http://www.scielo.br/jaos>

1.2 The corresponding author should retain the original file in Word format as well as illustrations (when applicable).

1.3 The original file containing the main manuscript must be submitted without the authors' identification and affiliations. The cover page must be submitted as a supplementary file containing the names of the authors, affiliations and correspondence address.

1.4 Figures must be submitted as supplementary files according to the specifications of item 2.1 regarding the form and preparation of manuscripts.

1.5 Tables must be prepared in Word format and inserted after the references at the end of the original Word file.

1.6 The submission Form, signed by ALL the authors, must be submitted as a supplementary file containing the following text:

By signing the Submission Form, the authors state:

Copyright transfer: In the event of publication of the above mentioned manuscript, we, the authors, transfer to the **Journal of Applied Oral Science** all rights and interest of the manuscript. This document applies to translations and any preliminary presentation of the contents of the manuscript that has been accepted, but yet not published. If any authorship modification occurs after submission, a document with of agreement of all authors is required to be kept by the Editor-in-Chief. Exclusion of authors may only be accepted by his/her own request.

Responsibilities of the authors: I hereby state that:

The content is original and does not consist of plagiarism or fraud;

The work is not under consideration or will be submitted to other journal until a final decision is issued by this journal;

I have effectively contributed to this work and am familiar with its contents;

I have read the final version and assume the responsibility for its contents. I understand that if the work, or part of it, is considered deficient or a fraud, I take shared responsibility with the other authors.

Release of conflict of interest:

All my affiliations, corporate or institutional, and all sources of financial support to this research are properly acknowledged, except when mentioned in a separate letter. I certify that do not have any commercial or associate interest that represents a conflict of interest in connection with the submitted manuscript.

PRINT NAME: _____ SIGNATURE: _____ DATE: _____

1.7 For further information on the online submission system, please refer to the TUTORIAL FOR AUTHORS available at: <http://www.scielo.br/jaos>

[[Home](#)] [[About this journal](#)] [[Editorial Board](#)] [[Subscription](#)]

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>All the content of the journal, except where otherwise noted, is licensed under a [Creative Commons License](#)

Serviço de Biblioteca e Documentação
Alameda Octávio Pinheiro Brisola, 9-75
17012-901 Bauru SP
Tel.: +55 14 3235-8373
revista@fob.usp.br

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

A inserção da pesquisa na temática saúde ambiente e na ótica interdisciplinar.

Devido ao alto índice de sucesso, o tratamento pulpar conservador, sempre que possível, deve ser indicado pois, além de ser uma técnica rápida, de fácil execução e baixo custo, constitui-se hoje em um tratamento definitivo, assumindo um caráter de grande importância sócio-econômica principalmente para populações de baixo poder aquisitivo, o que caracteriza uma alternativa clínica importante para ser utilizada nos serviços públicos de assistência odontológica e favorece ao restabelecimento da saúde do órgão dental, em resposta às condições bucais da população brasileira.

Desde que as exposições pulpares sejam tratadas em tempo hábil, com material e técnica apropriados e em condições favoráveis ao tratamento, o capeamento pulpar é uma alternativa conservadora viável que promove o restabelecimento da saúde pulpar e a formação de barreira dentinária, selando a exposição, mantendo a saúde dos tecidos acometidos e evitando a perda precoce do órgão dental.

Através dessa pesquisa, pretendeu-se avaliar a influência de um novo biomineral (otólitos de *Cynoscion acoupa*) no processo de neoformação de barreira mineralizada em exposições pulpares induzidas em dentes de animais experimentais com o intuito de identificar uma alternativa viável para proteção pulpar direta. Tendo em vista a busca de um material odontológico que apresente propriedades físicas, químicas e biológicas satisfatórias, seja de fácil manuseio, que induza a rápida reparação pulpar e com custo acessível à população de baixa renda, economicamente desfavorecida, torna-se compreensível a importância e o interesse sempre crescentes pela evolução de estudos em torno da aquisição de uma matéria-prima de origem natural.

Deve-se considerar também que o uso de produtos naturais em saúde muitas vezes demanda uma tecnologia relativamente simples e fácil aquisição, o que diminui os custos, representando, assim, mais uma vantagem se compararmos com outros materiais alternativos ao HC no capeamento pulpar. Estas características são requisitos essenciais para futuros materiais a serem usados no capeamento pulpar. Sendo assim, a motivação

de realizar outras pesquisas semelhantes, partindo deste trabalho, torna-se um desafio complementar para enriquecer ainda mais esta linha de pesquisa.

Neste contexto, o objeto de estudo desta pesquisa foi os otólitos, estruturas calcárias presentes no ouvido interno de peixes ósseos, cuja composição química, rica em minerais e proteínas colagênicas, é indicativa de uma possível atividade biomineralizadora. A opção pelo *Cynoscion acoupa* (pescada amarela) reside no fato de que esta espécie da família *Sciaenidae* é um importante recurso pesqueiro mundial. Além disso, na América do Sul é encontrada em águas tropicais e subtropicais da costa atlântica e em todo o litoral brasileiro, o que facilita a obtenção do biomineral.

Para a execução deste trabalho foi necessário o envolvimento de vários pesquisadores, dentre eles cirurgiões-dentistas de diversas especialidades (clínicos, radiologistas, patologistas), biólogos, farmacêuticos e médicos veterinários, cujos conhecimentos estão relacionados ao desenvolvimento, aprimoramento e aplicabilidade dos otólitos para indução da formação de barreira mineralizada em modelo canino. Este fato demonstra claramente a natureza interdisciplinar deste trabalho.

Desta forma, os resultados obtidos neste estudo sugerem que os otólitos podem representar um excelente exemplo de biomineral, supostamente por apresentarem uma porção inorgânica rica em elementos essenciais ao processo de mineralização, fase importante da neoformação de tecido mineralizado, bem como uma porção proteica, que poderia funcionar como matriz orgânica semelhante ao colágeno.

Portanto, este trabalho vem demonstrar, de maneira inovadora, a aplicabilidade deste resíduo pesqueiro abundante no litoral sergipano e brasileiro, em um campo da saúde que ainda é objeto de numerosas pesquisas. Outrossim, a comercialização dos otólitos poderá, futuramente, ser utilizada como uma fonte de renda adicional para a população que trabalha diretamente com a pesca.