



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

CARLUS ALBERTO OLIVEIRA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA POLPA DENTÁRIA DE RATOS APÓS PULPOTOMIA E
SELAMENTO PULPAR COM UMA PASTA À BASE DE *Anadenanthera colubrina*
(Vell.) Brenan E COM A PASTA ANTIBIÓTICA CTZ**

**CAMPINA GRANDE - PB
2020**

CARLUS ALBERTO OLIVEIRA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA POLPA DENTÁRIA DE RATOS APÓS PULPOTOMIA E
SELAMENTO PULPAR COM UMA PASTA À BASE DE *Anadenanthera colubrina*
(Vell.) Brenan E COM A PASTA ANTIBIÓTICA CTZ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, com área de concentração em Clínicas Odontológicas, da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), realizada em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Edja Maria Melo de Brito Costa

**CAMPINA GRANDE – PB
2020**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

S237a Santos, Carlus Alberto Oliveira dos.
Avaliação da polpa dentária de ratos após pulpotomia e selamento pulpar com uma pasta à base de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan e com a pasta antibiótica CTZ [manuscrito] / Carlus Alberto Oliveira dos Santos. - 2020.
58 p.
Digitado.
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2020.
"Orientação : Profa. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa ,
Coordenação do Curso de Odontologia - CCBS."
1. Odontopediatria. 2. Materiais dentários. 3. Fitoterapia. 4.
Dente decíduo. I. Título
21. ed. CDD 617.695

CARLUS ALBERTO OLIVEIRA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA POLPA DENTÁRIA DE RATOS APÓS PULPOTOMIA E
SELAMENTO PULPAR COM UMA PASTA À BASE DE *Anadenanthera colubrina*
(Vell.) Brenan E COM A PASTA ANTIBIÓTICA CTZ**

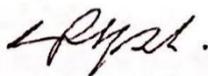
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, com área de concentração em Clínicas Odontológicas, da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), realizada em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Apresentada em 17/07/2020

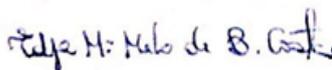
BANCA EXAMINADORA



Prof^o. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior/UNIT
(Membro titular / examinador 1)



Prof^o Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka /UEPB
(Membro titular / examinador 2)



Prof^a Dr^a Edja Maria Melo de Brito Costa / UEPB
(Membro titular / Orientadora)

A Deus, por ser meu fôlego de vida, porto seguro e por me amar incondicionalmente. Sem Ele, nada disso seria possível,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, inicialmente, ao autor da minha vida e fé, aquele que me sustentou, me tolerou e me atendeu mesmo sem que eu mereça. Somos tão confidentes, né Senhor? Lembra das lágrimas que derramei quando eu pensava que nada disso seria possível? Lembra das madrugadas em claro e das noites mal dormidas? Pois é... a sua paz e sua alegria sempre estiveram presentes ao amanhecer. Hoje te apresento novidade nos lábios e um coração agradecido. Muito obrigado meu **Deus!** “Aqueles que semeiam em lágrimas, com júbilo ceifarão...” (Salmos 126:5-6).

Aos meus pais **Maria da Luz** e **Alberto Oliveira** por todo apoio prestado, orações, pensamentos positivos e incentivos. Apensar da distância, tenho vocês sempre em meu coração. Vocês são os amores da minha vida!

Ah! os meus avós... quem me dera fossem eternos...! É com muito júbilo e alegria no coração que tenho o imenso prazer de escrever esses agradecimentos a vocês ainda em vida. O que seria de mim vovó **Socorro** e vovô **Vicente** se não fosse o cuidado e zelo de Deus manifesto em vocês. Como eu sinto saudades de morar com vocês, do gosto da comida simples, do cheiro de perfume de flores e do olhar sincero de alguém que me viu crescer e evoluir. Vocês são sinônimo de leveza, amizade e sempre acharão lugar em meu coração. Muito obrigado por tudo!

Aos meus familiares, representados pela minha tia **Alba Lúcia**, **Tio Beбето** e minhas primas **Tayanne Oliveira** e **Jamilly Adriele**, vocês foram as colunas de sustentação que me fizeram chegar até aqui. Muito obrigado por tudo! Amo vocês!

Em especial, agradeço a queridíssima professora e orientadora **Edja Maria**, por ter me aceitado como orientando e ter me acolhido tão bem, pelos direcionamentos e incentivos ao longo dessa jornada. Serei eternamente grato por todo conhecimento científico transmitido, por toda gentileza, sensibilidade e paciência. Um ser humano incrível e de muita luz! Quem tem a oportunidade de ser seu orientado sabe o quanto você é especial. Meus sinceros agradecimentos! “Bons professores são inestimáveis. Eles inspiram e entretêm, e você acaba aprendendo muita coisa mesmo sem se dar conta disso” (Nicholas Sparks). “Os bons se atraem” (Edja Maria).

Sem colaboração e dedicação do professor **Cassiano Nonaka** a realização deste trabalho jamais seria possível. Professor, gratidão por toda disposição, ensinamentos e orientações concedidas. És uma inspiração para mim! Um exemplo de competência, paciência, inteligência e integridade. Aprendi muito com você e levarei seus ensinamentos e exemplo para minha vida docente. Talvez, palavras não sejam significativas para expressar, com justiça, a gratidão que sinto pela sua ajuda que foi fundamental para mim. Com todo carinho e de coração eu agradeço. “Transmitir conhecimento não é apenas falar o que sabe, mas inspirar novas atitudes” (Juliano Kimura).

Agradeço a **todos** os professores do PPGO/UEPB, aqui representados pela querida **Profª Ana Flávia Granville-Garcia** e pela **Profª Daniela Pita** que, com muita dedicação e garra, transmitiram conhecimentos científicos que levaremos para toda vida. Vocês são fantásticos! Meus sinceros agradecimentos! “Se fui capaz de ver mais longe é porque me apoiei em ombros de gigantes” (Isaac Newton).

Jamais poderia esquecer dos colegas de grupo (#TeamEdjaMaria) representados por **Priscilla Guimarães, Yuri Lins, Victor Vasconcelos e Carol Maia** por todo apoio científico prestado ao longo dessa jornada. Vocês foram essenciais! Gratidão!

À queridíssima amiga e colega de pós-graduação **Ana Luzia Batista** por toda gentileza, humildade e disposição em colaborar com este trabalho. Mesmo muito atarefada você disponibilizou seu tempo e sempre se mostrou muito solícita. Aprendi muito com você! És uma guerreira! Gratidão por toda gentileza e ensinamentos! Jamais esquecerei do que fizestes por mim. “Deus nos colocou no mundo para os outros” (Dom Bosco).

Aos meus amigos de pós-graduação, que em cada etapa, ganharam o meu coração, que fizeram parte da minha vida e história, em especial, gostaria de agradecer aos meus amigos **Karina Rolim e Diego Filipe** por me ajudarem em inúmeros momentos e por fazerem dos meus dias os mais felizes e risonhos. Vivemos muitos momentos, que jamais serão apagados da memória. Avante!

Às amigas **Larissa Targino e Janaína Targino** por todo auxílio e bondade prestados ao longo dessa jornada. Vocês mais que ninguém conhecem todas as minhas dores, sentimentos e dificuldades e nunca mediram esforços para me ajudar. A amizade de vocês, meninas, é fundamental! Serei eternamente grato!

Aos amigos **Ricardo Liberalino, Aparecida Tharlla, Carlos Moura e Prof^a Maria Regina Macedo** por todo carinho, amizade e cumplicidade. Vocês não fazem ideia de quanto foram importantes nesse processo. Muito obrigado por tudo! Prometo que agora não vou

mais furar os encontros do grupo... (risos). “Há amigos mais chegados que irmãos...”
(Provérbios 18:24).

Ao **Centro Universitário Facisa** pela disponibilização do espaço físico do biotério para realização dos experimentos e, em especial, agradeço as professoras **Kiara Oliveira** e **Marina Vilar** e a funcionária técnica **Tatiana (Tati)** por toda atenção e apoio prestados durante a realização desta pesquisa.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo apoio financeiro que possibilitaram a realização deste trabalho.

Aos **membros da banca examinadora** por todas as correções e sugestões necessárias para o melhoramento deste trabalho.

Por fim, meus sinceros agradecimentos aos **técnicos, servidores, e coordenadores do PPGO/UEPB** e todos que colaboraram de forma direta ou indireta para a realização do meu sonho.

“Ó profundidade das riquezas, tanto da sabedoria, como da ciência de Deus! Quão insondáveis são os seus juízos, e quão inescrutáveis os seus caminhos (...) porque d’Ele, e para Ele são todas as coisas: glória, pois, a Ele eternamente. Amém!”

SANTOS, C.A.O. Avaliação da polpa dentária de ratos após pulpotomia e selamento pulpar com uma pasta à base de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan e com a pasta antibiótica CTZ [dissertação]. Campina Grande: Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba; 2020.

RESUMO

Diferentes materiais são indicados para selamento pulpar após pulpotomia de dentes decíduos, entretanto, não há evidência científica que suporte a superioridade de uma medicação sobre a outra, e que atenda a todos os requisitos do material ideal. Nessa perspectiva, pesquisas para o desenvolvimento de produtos biocompatíveis e bioindutores, obtidos a partir de fontes naturais, são estimuladas. Objetivou-se com este estudo avaliar a resposta da polpa dentária de ratos, após pulpotomia e proteção do tecido pulpar remanescente com uma pasta à base de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan e com a pasta antibiótica CTZ, tendo como controle o hidróxido de cálcio pró-análise. Um total de 18 dentes, de 7 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), foram distribuídos em três grupos: 1) extrato da casca de *A. colubrina* + óxido de zinco (1:1) + polietilenoglicol 400, 2) hidróxido de cálcio P.A + polietilenoglicol 400, 3) pasta CTZ: tetraciclina, cloranfenicol, óxido de zinco (1:1:2) + eugenol. Quatro primeiros molares de um animal, sem intervenção, foram utilizados como padrão histológico. Após 72 horas e 15 dias da pulpotomia, os animais foram eutanasiados, as maxilas e mandíbulas foram dissecadas e processadas para as análises histológicas. Oscortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e avaliados morfológicamente, considerando o grau de infiltrado inflamatório, desorganização pulpar e formação de conteúdo mineralizado. As análises morfológicas revelaram que a pasta à base de *A. colubrina* propiciou intenso infiltrado inflamatório e necrose nas primeiras 72 horas, com sinais de remissão e tendência para deposição de tecido mineralizado no período de 15 dias. As amostras tratadas com a pasta CTZ mostraram intenso infiltrado inflamatório, áreas de necrose e nenhuma evidência de deposição de tecido mineralizado, nos dois tempos de avaliação. Nos espécimes tratados com a pasta de hidróxido de cálcio observaram-se discreto infiltrado inflamatório, áreas de necrose, com tecido pulpar subjacente normal, no período de 72 horas; e deposição intensa de tecido mineralizado na área da exposição pulpar no período de 15 dias. Nenhuma das pastas testadas apresentou resultados iguais ou melhores do que aqueles obtidos com a pasta de hidróxido de cálcio. A pasta CTZ, produziu efeitos indesejáveis ao tecido pulpar em todas

as amostras analisadas. Os resultados com a pasta à base de *A. colubrina* sinalizaram um possível potencial terapêutico como agente de proteção pulpar, entretanto, novos estudos devem ser realizados utilizando formulações com concentrações e proporções padronizadas.

Palavras-chave: Pulpotomia. Dente decíduo. Fitoterapia. Odontopediatria. Materiais dentários.

ABSTRACT

Different materials are indicated for pulp sealing after the pulpotomy of primary teeth, however, there is no scientific evidence to support the superiority of one medication over the other, and that meets all the requirements of the ideal material. In this perspective, research for the development of biocompatible and bioinductive products, to be harnessed from natural sources, is encouraged. The objective of this study was to evaluate the responses of rats' dental pulp, after the pulpotomy and protection of the remaining pulp tissue through a paste based on *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan and through the antibiotic paste CTZ, having calcium hydroxide as control for analysis. A total of 18 teeth, from 7 Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*), were divided into three groups: 1) *A. colubrina* bark extract + zinc oxide (1: 1) + polyethylene glycol 400, 2) PA calcium hydroxide + polyethylene glycol 400, 3) CTZ paste: tetracycline, chloramphenicol, zinc oxide (1: 1: 2) + eugenol. In addition, the four first molars from an extra animal were used, without intervention, as a histological pattern. 72 hours after pulpotomy, half of the animals were euthanized, their jaws and mandibles were dissected in blocks and processed for histological analysis. The same procedure was also done 15 days after pulpotomy with the remained animals. All histological sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) and were morphologically evaluated, considering the degree of inflammatory infiltrate, pulp disorganization and formation of mineralized content. The morphological analysis revealed that the paste based on *A. colubrina* provided an intense inflammatory infiltrate and necrosis in the first 72 hours, with signs of remission and a tendency to deposit mineralized tissue in the period of 15 days. The samples treated with the CTZ paste showed intense inflammatory infiltrate, areas of necrosis and no evidence of deposition of mineralized tissue, in both evaluation periods. In the specimens treated with the calcium hydroxide paste, there was a slight inflammatory infiltrate, areas of necrosis, with underlying normal pulp tissue, within 72 hours; and intense deposition of mineralized tissue in the pulp exposure area within 15 days. None of the tested pastes showed the same or better results than those with calcium hydroxide paste, especially CTZ paste, which produced undesirable effects on pulp tissue in all analyzed samples. The results with the paste based on *A. colubrina* signaled a possible therapeutic potential as a pulp protection agent, however, further studies should be performed using standardized formulations.

Keywords: Pulpotomy. Primary tooth. Phytotherapy. Pediatric Dentistry. Dental materials.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACAM-	Arruda Câmara.
BMP1-	Do inglês, <i>bone morphogenetic protein – 1</i> .
CEEA -	Comissão de Ética em Experimentação Animal.
CIOMS -	<i>Council for International Organizations of Medical Sciences.</i>
COBEA -	Código Brasileiro de Experimentação Animal
CTZ -	Cloranfenicol, tetraciclina, óxido de zinco e eugenol.
DAMP -	Do inglês, <i>damage associated molecular pattern</i> , traduzido como padrão molecular associado ao patógeno.
DL -	Dose letal.
DSPP -	Do inglês, <i>dentin sialophosphoprotein</i> , traduzido como sialofosfoproteína dentinária.
EDTA -	Do inglês, <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> , traduzido como ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO -	Espécies reativas de oxigênio.
GC-MS -	Do inglês, <i>pyrolysis-gas chromatography/ mass spectrometry</i> , traduzido como cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
HC -	Hidróxido de cálcio.
HE -	Hematoxilina e eosina.
ICLAS -	<i>International Council for Laboratory Animal Science.</i>
IL-1β -	Do inglês, <i>interleukine 1(beta)</i> , traduzido como interleucina 1 beta.
IL-6 -	Do inglês, <i>interleukine 6</i> , traduzido como interleucina 6.
IL-8 -	Do inglês, <i>interleukine 8</i> , traduzido como interleucina 8.
IL-10-	Do inglês, <i>interleukine 10</i> , traduzido como interleucina 10.
IL-12-	Do inglês, <i>interleukine 12</i> , traduzido como interleucina 12.
ISO-	<i>International Organization for Standardization.</i>
LPS -	Lipopolissacarídeos.
MMP-	Do inglês, <i>matrix metalloproteinase</i> traduzido para metaloproteinase da matriz.
MTA -	Do inglês, <i>mineral trioxide aggregate</i> , traduzido como agregado trióxido mineral.

OZE -	Óxido de zinco e eugenol.
P.A.-	Pró-análise
PAMP -	Do inglês, <i>pathogen associated molecular pattern</i> , traduzido como padrão molecular associado ao patógeno.
PEG -	Polietilenoglicol
RRP -	Receptores reconhecedores de patógenos.
SisGen-	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético.
TLR 1-	Do inglês, <i>tolloid-related1</i> , traduzido como peptidase TLR1.
UEPB -	Universidade Estadual da Paraíba.
UNIFACISA -	Centro Universitário Facisa.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Quadro 1 - Compostos fitoquímicos identificados no extrato da <i>A. colubrina</i> , por GC-MS.....	25
Quadro 2 - Distribuição dos grupos de acordo com o material e o tempo de avaliação.....	33
Quadro 3 - Escores e caracterização do infiltrado inflamatório presente no tecido pulpar.....	35
Quadro 4 - Escores e caracterização da desorganização do tecido pulpar.....	36
Quadro 5 - Escores e caracterização da formação de dentina reparadora próximo a área de exposição.....	36
Figura 1 - Ilustração da remoção da casca do caule da <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell) Brenan.....	32
Figura 2 - Sequência dos procedimentos operatórios com o animal sedado. (A) Abertura coronária e exposição pulpar; (B) irrigação com solução fisiológica 0,9% e aspiração; (C) selamento da cavidade com cimento de óxido de zinco e eugenol.....	34
Figura 3 - Fotomicrografias representativas do tecido pulpar de dentes molares de ratos, após pulpotomia e proteção pulpar com as pastas à base de <i>A. colubrina</i> , CTZ e hidróxido de cálcio, nos períodos experimentais de 72 horas e 15 dias de avaliação, além do corte histológico de um dente molar de rato sem intervenção (padrão histológico).....	39
Gráfico 1 - Representação gráfica dos resultados da intensidade de infiltrado inflamatório distribuídos de acordo com as formulações testadas, escores e tempos de avaliação.....	37
Gráfico 2 - Representação gráfica dos resultados da desorganização da polpa distribuídos de acordo com as formulações testadas, escores e tempos de avaliação.....	38
Gráfico 3 - Representação gráfica dos resultados da formação de dentina reparadora distribuídos de acordo com as formulações testadas, escores e tempos de avaliação.....	38

SUMÁRIO

	Página
1	INTRODUÇÃO..... 16
2	REFERENCIAL TEÓRICO..... 18
2.1	Terapia pulpar conservadora..... 18
2.2	Materiais de selamento pulpar..... 20
2.3	Produtos naturais na terapia pulpar..... 23
2.3.1	Anadenanthera colubrina..... 24
2.4	Polpa dentária e inflamação pulpar..... 27
3	OBJETIVOS..... 30
3.1	Objetivo Geral..... 30
3.2	Objetivos Específicos..... 30
4	MATERIAIS E MÉTODOS..... 31
4.1	Caracterização do estudo..... 31
4.2	Considerações éticas..... 31
4.3	Coleta do material vegetal..... 32
4.4	Preparação do extrato de <i>A. colubrina</i> 32
4.5	Modelo animal e ambiente de experimentação..... 32
4.6	Grupos de animais e preparação dos materiais..... 33
4.7	Procedimentos anestésicos e operatórios..... 33
4.8	Análises macroscópica dos espécimes..... 35
4.9	Preparação dos espécimes e análise histomorfológica..... 35
5	RESULTADOS..... 37
6	DISCUSSÃO..... 40
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 46
	REFERÊNCIAS..... 47
	ANEXOS..... 56

1 INTRODUÇÃO

A ocorrência de traumatismo dentário com exposição da polpa dentária é comum em crianças e adolescentes (ABUELNIEL *et al.*, 2020), situação clínica que exige cuidados que estimulem eventos celulares capazes de reparar o dano pulpar (TAYLOR *et al.*, 2019). Outra condição responsável pela exposição pulpar é a cárie dentária, que constitui a doença bucal mais comum nesses grupos etários (BJØRNDAL *et al.*, 2019; BRITO *et al.*, 2020). Apesar da recomendação atual da remoção seletiva do tecido cariado, em lesões extensas e profundas, ter minimizado os riscos de exposição pulpar (BANIHANI *et al.*, 2018; DUNCAN *et al.*, 2019), a pulpotomia nesses casos ainda é uma realidade (TAYLOR *et al.*, 2019). Nesse contexto, o capeamento pulpar direto, a curetagem pulpar e a pulpotomia são as alternativas terapêuticas mais indicadas, a depender do estágio inflamatório e do tipo de exposição pulpar (AGUILAR; LINSUWANONT *et al.*, 2011; CASSOL *et al.*, 2019; RAO *et al.*, 2020; SADAF, 2020).

Diversos materiais são usados em pulpotomia em dentes decíduos, como o hidróxido de cálcio (LI *et al.*, 2019), formocresol (OLIADARANI *et al.*, 2018; EL MELIGY *et al.*, 2019; MESLMANI *et al.*, 2020), a pasta antibiótica CTZ (TAKUSHIGE *et al.*, 2009; NAKORNCHAI *et al.*, 2010) e o agregado de trióxido mineral (MTA) (AWAWDEH *et al.*, 2018; GHONIEM *et al.*, 2018; GAWAD *et al.*, 2020). Apesar do sucesso clínico e radiográfico comprovado ao longo dos anos, a eficácia dos vários agentes sugeridos para proteção pulpar vem sendo bastante discutida, inclusive o hidróxido de cálcio, que corresponde o material mais utilizado (MUSALE *et al.*, 2018; RAO *et al.*, 2020).

O material ideal para proteger a polpa dentária remanescente deve ter boas propriedades físicas e biológicas, como selar a polpa residual, ser biocompatível e bioindutor, apresentar atividade antimicrobiana e anti-inflamatória, além de baixo custo (STRINGHINI-JUNIOR *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2019; PAULA *et al.*, 2020; BOSSÙ *et al.*, 2020). Porém, nenhum material apresenta todos esses requisitos. Há relatos de inconvenientes ou limitações relacionadas à toxicidade, reação de hipersensibilidade, baixa adesão, reabsorção dentária, manchamento coronário e necrose pulpar, o que vem justificando os investimentos para investigações nesta área (SMAÏL-FAUGERON *et al.* 2018; GOPALAKRISHNA *et al.*, 2019; MARCONYAK *et al.*, 2016; ABUELNIEL *et al.*, 2020; JUNQUEIRA *et al.* 2018; BANIHANI *et al.*, 2019).

Na tentativa de manter o dente decíduo até a sua esfoliação, muitos dentistas lançam mão de técnicas ou materiais, especialmente nos serviços públicos assistenciais, que não

apresentam evidências científicas concretas, como é o caso da utilização da pasta antibiótica CTZ em pulpotomias (OLIVEIRA *et al.*, 2006). O veículo desta pasta é o eugenol, considerado um agente citotóxico (LEE *et al.*, 2017; JUNG *et al.*, 2018; LOPES *et al.*, 2019).

Nessa perspectiva, a utilização de derivados de produtos naturais em associação ou não com produtos sintéticos tem atraído o interesse da comunidade científica, para formulação de novos medicamentos com potencial regenerativo da polpa dentária, especialmente com derivados naturais (LIMA *et al.*, 2011; MACEDO-COSTA *et al.*, 2019; SAIKIRAN *et al.*, 2019). Dentre os produtos naturais utilizados em pulpotomia, a própolis (KUSUM *et al.*, 2015; ALOLOF *et al.*, 2016; LIKITPONGPIPAT *et al.*, 2018), o tomilho (LIN *et al.*, 2014; ALOLOF *et al.*, 2016), *Aloe vera* (KALRA *et al.*, 2017), o alho (*Allium sativum oil*) (MOHAMMAD *et al.*, 2015), o óleo resinoso de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) (LIMA *et al.*, 2011) e a curcumina (*Curcuma longa*) (PRABHAKAR *et al.*, 2019) têm apresentado resultados comparáveis aos obtidos com MTA e hidróxido de cálcio, embora as evidências científicas para o uso dessas substâncias em dentes decíduos sejam limitadas.

Considerando as propriedades biológicas das plantas medicinais e os requisitos de um material protetor da polpa dentária, como por exemplo, ter ação antimicrobiana e anti-inflamatória, destaca-se a planta medicinal *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, popularmente conhecida como angico, frequentemente encontrada no bioma caatinga do semiárido paraibano. Já foram evidenciados seus efeitos anti-inflamatório (CARSOSO-JUNIOR *et al.*, 2020), cicatrizante (PESSOA *et al.*, 2015), antimicrobiano (ROCHA *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2014; NUNES *et al.*, 2015; ROCHA *et al.*, 2017), antibiofilme (SILVA *et al.*, 2019), anti-lipoxigenase, imunomodulador e antinociceptivo (GUARNIERI *et al.*, 2019), antioxidante (LIMA *et al.*, 2014) e baixa toxicidade (LIMA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2019). Os efeitos medicinais desse vegetal são atribuídos, especialmente, a sua complexa composição química, constituída por taninos, flavonoides e proantocianidinas (PESSOA *et al.*, 2015).

Nesse contexto, este estudo teve como objetivo analisar a resposta do tecido pulpar dentário de ratos, após pulpotomia e proteção com uma pasta à base de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan e com a pasta antibiótica CTZ, tendo como controle o hidróxido de cálcio pró-análise (P.A.), com a perspectiva de apontar o extrato de *A. colubrina* como fonte de compostos bioativos para uma possível medicação de selamento pulpar. Assim como, investigar o efeito biológico da pasta antibiótica CTZ sobre a polpa dentária, cuja aplicação na Odontopediatria é assegurada pelo seu sucesso clínicorradiográfico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O texto a seguir versará sobre os principais tópicos relacionados à terapia pulpar conservadora em dentes decíduos, considerando os respectivos materiais de selamento pulpar e a resposta da polpa frente a diferentes injúrias.

2.1 Terapia pulpar conservadora

A terapia pulpar em dentes decíduos representa uma das áreas mais debatidas e controversas da Odontopediatria (HUGAR *et al.*, 2017), principalmente pela escassez de pesquisas que estabeleçam a superioridade de um dos tipos de medicação em relação a indução de uma resposta pulpar favorável (LIMA *et al.*, 2011; SUNITHA *et al.*, 2017; LUENGO-FEREIRA *et al.*, 2019; BOSSÙ *et al.*, 2020).

Dentre as modalidades de terapia pulpar indicadas em Odontopediatria destacam-se a pulpotomia e o capeamento pulpar direto (RAO *et al.*, 2020), sendo fortemente preconizadas pela Academia Americana de Odontopediatria (AAPD) como principais alternativas terapêuticas para o tratamento de dentes decíduos e permanentes com inflamação pulpar reversível (TAYLOR *et al.*, 2019).

A pulpotomia está alicerçada no fato de que, após a amputação cirúrgica da polpa coronária afetada, o tecido pulpar radicular permanece em um estado saudável, favorecendo a existência de um ambiente propício para o desenvolvimento normal do dente permanente (LOURENÇO NETO *et al.*, 2013; EL MELIGY *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2020). Além disso, permite a manutenção da vitalidade dentária e viabiliza o desenvolvimento de dentes imaturos, incluindo o fechamento do ápice radicular (LI *et al.* 2019; PAULA *et al.*, 2020).

Existe um debate científico acerca do sucesso clínico da aplicação de técnicas pulpares conservadoras em dentes permanentes. Diante dessa afirmação, a revisão sistemática e metanálises realizadas por TAYLOR *et al.*, (2019) incluíram uma síntese completa e quantitativa sobre a realização de pulpotomias em molares permanentes de crianças. Evidenciaram que este procedimento é preconizado para tratamento de primeiros molares permanentes destruídos por cárie e enfatizam a limitação existente em procedimentos pulpares mais radicais (pulpectomia) em pacientes infantis.

Normalmente, o prognóstico das terapias conservadoras em casos de exposição pulpar por cárie é menos favorável em comparação com exposições por fraturas (TAYLOR *et al.*, 2019; ABUELNIEL *et al.*, 2020), possivelmente, em função do nível de

comprometimento pulpar e da presença do componente microbiológico. Dessa forma, destaca-se a importância de indicar um material de selamento pulpar, que apresente propriedades anti-inflamatória, cicatrizante e antimicrobiana. O sucesso da pulpotomia depende não apenas do diagnóstico da polpa dentária inflamada, mas também da seleção de um medicamento efetivo e biocompatível (OLIADARANI *et al.*, 2018; GAWAD *et al.*, 2020).

A presença de agentes infecciosos ou subprodutos tóxicos advindos do microbioma cariogênico ou meio externo no ato da exposição pulpar é decisivo no sucesso do tratamento (RICKETTS *et al.*, 2013; ABUELNIEL *et al.*, 2020). Quando toxinas como as produzidas por bactérias atingem a dentina, a inflamação pulpar geralmente ocorre. Se a lesão de cárie não é removida ou os dentes traumatizados não são devidamente tratados, este processo inflamatório avança (LOPES; SIQUEIRA-JÚNIOR, 2015).

No estudo de coorte de Banihani *et al.* (2019), avaliou-se a eficácia e a efetividade de técnicas convencionais e seletivas de remoção de tecido cariado. Observou-se que mais da metade dos casos de insucesso clínico culminaram na realização de pulpotomia, como procedimento reparador. Dos dentes tratados pela técnica convencional (não seletiva) de remoção do tecido cariado realizou-se a pulpotomia secundariamente em 75,7% dos casos, ao passo que apenas 24,3% dos casos tratados pela remoção seletiva da lesão cariosa findaram em pulpotomia como procedimento reparador. Nota-se que, em ambos os casos de insucesso, com remoção seletiva ou não, a pulpotomia ainda foi o procedimento reparador de escolha.

Dentre as principais vantagens da pulpotomia na clínica de Odontopediatria, destacam-se a eficácia e facilidade terapêutica e rapidez no procedimento, sobretudo em crianças com difícil comportamento, além de ser uma técnica menos dispendiosa, apresentando um valor social indiscutível (MUSALE *et al.*, 2018; JUNQUEIRA *et al.*, 2018).

Em uma revisão publicada por DUNCAN *et al.* (2019), em nome da Sociedade Europeia de Endodontia, em um importante periódico da área, foi relatado que existem questões críticas sobre a superioridade das técnicas (seletiva e não seletiva) para remoção do tecido cariado e qual o melhor biomaterial indicado para tratamentos pulpares conservadores, em função da fraca evidência científica, suportada apenas em alguns relatos de casos, séries de casos e estudos de coorte com pequenos grupos amostrais.

Os requisitos essenciais para um material de capeamento da polpa incluem boas propriedades físicas e biológicas, como selar a polpa residual, promover a cicatrização do tecido remanescente, não ser reabsorvível, ser biocompatível e apresentar atividade antimicrobiana e bioindutora. Considerar esses elementos, durante a escolha de um agente de

selamento pulpar, é importante para garantir o sucesso do tratamento e evitar a difusão de processos inflamatórios ao longo da raiz (ROYER *et al.*, 2018; LUENGO-FEREIRA *et al.*, 2019).

2.2 Materiais de selamento pulpar

Diversos materiais ou intervenções podem ser usados na pulpotomia em dentes decíduos e permanentes. Alguns dos tratamentos promovem a desvitalização, como a eletrocirurgia (GOPALAKRISHNAN *et al.*, 2018; GAWAD *et al.*, 2020) e o formocresol (OLIADARANI *et al.*, 2018; EL MELIGY *et al.*, 2019; MESLMANI *et al.*, 2020), embora este último não tenha mais indicação para essa finalidade, em função dos efeitos citotóxicos e mutagênicos (JAMALI *et al.*, 2018). Salienta-se que em um passado não muito distante o formocresol foi considerado como a medicação *Gold Standard* para selamento pulpar em dentes decíduos, principalmente por apresentar alto sucesso clínico, baixo custo e fácil aplicação (GAWAD *et al.*, 2020).

O estudo clínico realizado por Erdem *et al.* (2011) avaliou o formocresol, o sulfato férrico, o óxido de zinco e eugenol (OZE) e o MTA como agentes de selamento pulpar, após pulpotomia em dentes decíduos cariados. O sucesso clínico e radiográfico foi satisfatório para a maioria dos materiais, com exceção do OZE, que apresentou resultado significativamente inferior quando comparado ao MTA.

Outros biomateriais induzem a regeneração, a exemplo do hidróxido de cálcio, proteínas osteogênicas, MTA, biodentine (EL MELIGY *et al.*, 2019; CASSOL *et al.*, 2019), e o 3Mixtatin (associação antibiótica – metronidazol, minociclina e ciprofloxacina) (JAMALI *et al.*, 2018). Apesar do sucesso clínico, nenhum material, seja ele de origem sintética ou natural, preenche todos os requisitos esperados (AL-DLAIGAN *et al.*, 2015). Há relatos de feitos indesejáveis relacionados à toxicidade e reação de hipersensibilidade (3Mixtatin e CTZ), reabsorção dentária (hidróxido de cálcio) e manchamento coronário (MTA) (MARCONYAK *et al.*, 2016; ABUELNIEL *et al.*, 2020), o que fortalece a necessidade de estudos nesta área.

A pasta antibiótica CTZ (cloranfenicol, tetraciclina, óxido de zinco e eugenol) corresponde a outro material utilizado em pulpotomias de dentes decíduos, considerado um agente de selamento com altas taxas de sucesso clínico e radiográfico (TAKUSHIGE *et al.*, 2009; NAKORNCHAI *et al.*, 2010; MOURA *et al.*, 2018). Essa formulação foi desenvolvida

como um método alternativo para tratamento de dentes decíduos com polpa necróticas ou inflamadas que apresentassem ou não a presença de abscesso ou fístulas. Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos da aplicação da pasta antibiótica CTZ sobre polpa viva (BRUNO *et al.*, 2006).

Os componentes da pasta CTZ são associados a efeitos citotóxicos. Por exemplo, o cloranfenicol é considerado um medicamento hepatotóxico e hematotóxico; a tetraciclina é associada a efeitos hepatotóxicos, além de ocasionar manchamento dentário (OLIVEIRA *et al.*, 2006; LUENGO-FEREIRA *et al.*, 2019), e o eugenol, um agente citotóxico (LEE *et al.*, 2017; JUNG *et al.*, 2018; LOPES *et al.*, 2019).

Estudos já relataram baixo desempenho clínico e alguns inconvenientes da pasta CTZ, tais como, a pigmentação da coroa do dente tratado (TRAIRATVORAKUL *et al.*, 2012; MARIZ *et al.*, 2014; DAHER *et al.*, 2015), além de produzir reação de hipersensibilidade, em função dos seus componentes (OLIVEIRA; COSTA, 2006; SOUSA *et al.*, 2014; BARROS; NERES, 2017). Luengo–Fereira *et al.* (2019) ao comparar a pasta CTZ com o formocresol em um estudo, com 2 anos de acompanhamento clínico e radiográfico, não observaram superioridade estatística significativa que justifique a aplicação clínica do CTZ em dentes vitais e sugeriu novas investigações.

O hidróxido de cálcio corresponde ao material de proteção pulpar mais utilizado na Odontologia, provavelmente, por ser um material que apresenta ação antibacteriana, biocompatibilidade, capacidade de formação de barreira mineralizada, selamento da polpa, custo relativamente baixo (FREIRES; CAVALCANTI, 2011; MASS; ZILBERMAN, 2011; ROYER, 2018) e altas taxas de sucesso clínico (AKCAY *et al.*, 2014; YILDIZ; TOSUN, 2014; CARUSO *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2019). Em contraposição, quando comparado ao MTA, Liu *et al.* (2011) verificaram baixos índices de sucesso, além de falhas, como o desenvolvimento de reabsorção interna.

As metanálises realizadas por Stringhini-Junior *et al.* (2015), o hidróxido de cálcio foi a medicação que mais apresentou falhas. Apesar do hidróxido de cálcio ser considerado um material regenerador da polpa, a falha clínica com seu uso é considerável, sobretudo porque a matriz mineralizada neoformada apresenta-se tênue e porosa, o que permite um maior acúmulo de agentes infecciosos, comprometendo o seu sucesso (GANDOLFI *et al.*, 2015). Outra causa provável de insucesso da pulpotomia com hidróxido de cálcio seria a presença de um coágulo sanguíneo entre a superfície da polpa e a camada de hidróxido de cálcio, impedindo o contato direto do material com o tecido pulpar (ATASEVER *et al.*, 2019).

Os estudos de Oliveira *et al.* (2013) e Grewal *et al.* (2016) revelaram falhas clínicas e radiográficas, ao longo do período de estudo, no grupo do hidróxido de cálcio, com observação frequente de áreas necróticas nos canais radiculares e reabsorção interna.

Costa e Silva *et al.* (2019) realizaram um estudo clínico randomizado com o objetivo de comparar o MTA ao hidróxido de cálcio manipulado com solução salina e com polietilenoglicol (PEG), em pulpotomia de dentes decíduos. O hidróxido de cálcio manipulado com PEG apresentou melhor desempenho clínico quando comparado com aquele manipulado com solução salina (67% de reabsorções internas), nos períodos de 3 a 12 meses de acompanhamento. No entanto, ambas as combinações apresentaram resultados clínico e radiográfico inferiores as pulpotomias realizadas com MTA.

Acredita-se que veículos viscosos, como o PEG, funcionem como um sistema de liberação gradual do hidróxido de cálcio, o que não ocorre quando o hidróxido de cálcio é manipulado com água ou solução salina. Além disso, a água disponível no material manipulado é absorvida pelo conteúdo pulpar, produzindo espaços vazios (infiltrações) entre o material restaurador e o tecido pulpar remanescente, além de favorecer o acúmulo de microrganismos e a reabsorção dentária (COSTA E SILVA *et al.*, 2019).

O MTA também é indicado para pulpotomia em dentes decíduos e apresenta altas taxas de sucesso clínicoradiográfico (AWAWDEH *et al.*, 2018; GHONIEM *et al.*, 2018; JUNQUEIRA *et al.*, 2018; SMAÏL-FAUGERON *et al.*, 2018; GAWAD *et al.*, 2020). No entanto, seu custo relativamente alto pode ser um fator limitante, principalmente em países em desenvolvimento. Segundo BANIHANI *et al.* (2019), o custo de pulpotomias com MTA como medicação é seis vezes maior quando comparado com outros materiais, a exemplo do sulfato de ferro (JUNQUEIRA *et al.*, 2018; PRATIMA *et al.*, 2018; RAO *et al.*, 2020). O custo total do tratamento com MTA é incompatível com os preços estabelecidos pelos sistemas de assistência à saúde em muitos países, de modo que pesquisas devem ser encorajadas na descoberta de novas medicações com taxas de sucesso clínico equiparável ao MTA, mas que apresentem, dentre outras características, baixo custo e menor tempo de presa (SMAÏL-FAUGERON *et al.*, 2018). Outra desvantagem atribuída ao uso do MTA como medicação em pulpotomias é a sua capacidade de ocasionar manchamento dentário (JUNQUEIRA *et al.*, 2018), mesmo quando é utilizado o MTA branco (ABUELNIEL *et al.*, 2020), além de reabsorção interna ou de furca (CARDOSO-SILVA *et al.*, 2014)

O biodentine foi introduzido no mercado com o objetivo de superar algumas falhas do MTA. Trata-se de um biomaterial a base de silicato de cálcio, considerado pelos fabricantes

um “substituto da dentina” (ABUELNIEL *et al.* 2020). Seus achados clínicos e radiográficos são equiparáveis ao MTA em termos de biocompatibilidade e indução de uma barreira mineralizada, e são superiores aos do hidróxido de cálcio (GREWAL *et al.* 2016; CARUSO *et al.*, 2018).

Algumas melhorias adicionais relacionadas a manipulação, tempo de presa e radiopacidade foram observadas, além de não produzir descoloração dentária. Provavelmente, devido a substituição do óxido de bismuto pelo óxido de zircônio. Previsivelmente, essa melhoria das propriedades físico-químicas do biodentine em relação ao MTA vem acompanhada de um alto custo, dificultando a sua aplicação em serviços públicos e filantrópicos de saúde (CARUSO *et al.*, 2018; ABUELNIEL *et al.* 2020).

Outro material bastante investigado é o Bio-C Pulpo®, um cimento biocerâmico, cujo principal composto ativo é o silicato de cálcio, que atua juntamente com o fluoreto de cálcio, o cálcio aluminato e hidróxido de cálcio no processo de mineralização. O cloreto de cálcio foi adicionado a composição do biocerâmico para reduzir o tempo de presa e manipulação do material, sendo considerado um forte atraente para o atendimento odontopediátrico, entretanto, apresenta custo elevado (COSME-SILVA *et al.*, 2018). Um experimento realizado por Cosme-Silva *et al.* (2018) avaliou a reposta do tecido subcutâneo de ratos frente ao MTA, que induziu uma inflamação mais exacerbada nos períodos iniciais, quando comparado ao seu grupo teste (BIO-C Pulpo®). Outrossim, uma cápsula fibrosa formou-se ao redor de ambos os materiais após uma avaliação de 7 e 15 dias.

2.3 Produtos naturais na terapia pulpar

Em função das propriedades biológicas e do potencial terapêutico dos compostos bioativos oriundos dos vegetais sobre células humanas, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de introduzir na prática clínica endodôntica, medicações de natureza vegetal eficazes na reparação da polpa dentária. Essas pesquisas são realizadas com compostos vegetais, substâncias vegetais isoladas ou em associação com algum veículo já existente no mercado, com o intuito de minimizar os efeitos indesejáveis dos materiais disponíveis e desenvolver um novo biomaterial, capaz de gerar respostas pulpares favoráveis a reparação (ALAGL *et al.*, 2017; CARUSO, 2018).

Nesse sentido, buscam-se medicamentos alternativos para proteção da polpa dentária após pulpotomia, que sejam clinicamente e biologicamente aceitáveis (EMERALDO *et al.*,

2013). É reforçada a importância de mais estudos nessa área, sobretudo diante das comprovadas e indesejadas respostas biológicas aos produtos disponíveis (KALRA *et al.*, 2017; MACÊDO-COSTA; SANTOS, 2019).

2.3.1 *Anadenanthera colubrina*

Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan foi selecionada para este estudo em função dos achados prévios em relação as suas propriedades biológicas. Verificamos que o extrato da casca da *A. colubrina* apresenta propriedades antioxidante (LIMA *et al.*, 2014), anti-inflamatória (PESSOA *et al.*, 2015; MAIA – dados não publicados), antiproliferativa (LIMA *et al.*, 2014) antimicrobiana (NUNES, 2011; ROCHA, 2014), além de baixa toxicidade (SILVA *et al.* 2019; LIMA *et al.*, 2018) todas consideradas importantes para um material de selamento pulpar.

Além desses estudos, são encontrados na literatura outros que demonstram a atividade anti-inflamatória e antimicrobiana desta planta. Santos *et al.* (2013) observaram atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato da *A. colubrina*. Barreto *et al.* (2016) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos do caule da *A. colubrina* contra bactérias resistentes a várias drogas. O extrato apresentou-se como uma fonte de compostos bioativos, capazes de potencializar a atividade dos aminoglicosídeos contra o *Staphylococcus aureus*.

No Brasil, as espécies do gênero *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, são conhecidas popularmente como angico ou angico branco. Pertence à subfamília *Mimosoideae* (*Leguminosae*), com ocorrência frequente no bioma Caatinga. *A. colubrina* é uma das plantas mais usadas na medicina popular, como anti-inflamatório, antinociceptiva, solução adstringente e para tratar problemas respiratórios, como bronquite (COSTA, *et al.*, 2013; LIMA, *et al.*, 2014; MOTA, 2016; MOTA *et al.*, 2017).

A caracterização fitoquímica do extrato da casca de *A. colubrina* realizada por Lima *et al.* (2018) revela uma complexa composição química do vegetal, com destaque para o alto teor de polifenóis (53,18% do equivalente em ácido gálico). O teor de tanino foi 8,77% equivalente às catequinas e o teor de flavonóides foi 0,28% equivalente à quercetina (LIMA *et al.*, 2014). O quadro 1 mostra os fitoquímicos encontrados no extrato de *A. colubrina* utilizado neste estudo, por cromatografia gasosa com espectrômetro de massa (GC-MS) (LIMA, 2018).

Quadro 1 - Compostos fitoquímicos identificados no extrato da *A. colubrina*, por GC-MS.

COMPOSTOS	TR	IR	ÁREA (%)
Ácido 2-piperidinocarboxílico, 1TMS	8,404	1267	0,06
Ácido butanodióico, 2TMS	9,079	1319	0,02
Ácido glicérico, 3TMS	9,380	1343	0.01
Isoeugenol, 1TMS	11,065	1482	0.03
Ácido málico, 3TMS	11,248	1498	0.15
Eritritol, 4TMS	11,422	1513	0.01
Ácido eritrônico, 4TMS	12,151	1574	0.02
Ácido 4-hidroxibenzóico, 2TMS	12,918	1636	0.02
D-ribose, 2,3,4,5-tetraquis-O-(trimetilsilil) -, O-metiloxima	13,285	1664	0.01
Xilitol, 5TMS	14,295	1740	0.90
Xilitol, 5TMS	14,370	1745	0.1
β -D-xilopiranoose, 4TMS	14,510	1755	0.02
D - (+) - Galactopiranoose, 5TMS	16,390	1884	0.02
D-glucopiranoose, 5TMS	16,930	1920	1.37
D-glucopiranoose, 5TMS	17,100	1930	0.04
D-manitol, 6TMS	17,560	1960	0.18
Ácido gálico, 4TMS	17,800	1975	0.02
Ácido palmítico, 1TMS	18,965	2047	0.07
Mio-inositol, 6TMS	20,220	2125	0.27
Ácido esteárico, 1TMS	22,210	2246	0.02
Sacarose, 8TMS	29,378	2705	48.08
Catequina, 5 TMS	32,458	2920	0.52

Fonte: LIMA *et al.* (2018). TR – Tempo de retenção; IR – Índice de retenção.

Observa-se que a composição fitoquímica do extrato da casca da *A. colubrina* é caracterizada, especialmente, pela presença de flavonoides, taninos e procianidinas. Esses compostos são conhecidos por facilitar a reparação e cicatrização de feridas (PESSOA *et al.*, 2015). Segundo Souza *et al.* (2018), a ação antisséptica dos taninos é atribuída a sua capacidade de precipitação de proteínas no tecido lesionado, onde forma-se uma película protetora, dificultando a penetração microbiana. Os flavonoides têm ação antioxidante, inibem a ação das lipoxigenases, enzimas primordiais nos processos inflamatórios. As procianidinas apresentam atividade antioxidante, anti-inflamatória e antibacteriana, além de promover a biomodificação do colágeno dentinário, aumentando a resistência desta molécula à degradação enzimática, principalmente pelas metaloproteinases da matriz (MMP).

Na dentina estão presentes as MMP -2, -8, -9, 13 e -20, de forma inativa. Quanto ocorre eventos inflamatórios e infecciosos, os odontoblastos também são capazes de sintetizar e secretar MMP. Desta forma, segundo Seogullari-Dirihan *et al.* (2015), a aplicação das procianidinas sobre o substrato dentinário poderia promover uma inibição da degradação enzimática da matriz dentinária e inibir o estresse oxidativo e a síntese de MMP pelos odontoblastos subjacentes ao tecido dentinário, protegendo o complexo dentino-pulpar.

Uma importante enzima no processo de mineralização da pré-dentina e consequente formação de barreira mineralizada são as sialofostoproteínas dentinárias (DSPP), expressas nos odontoblastos e, em menos frequência, nos ameloblastos. Essa proteína é clivada em sialoproteína dentinária e fosfoproteína dentinária, pela ação de enzimas como a BPM1, TLR1 e as MMP's (SUZUKI *et al.*, 2009; RITCHIE, 2018). Apesar do efeito das procianidinas, fitoconstituente presente na *A. colubrina*, sobre as MMP's, ainda não se sabe se elas influenciam positivamente ou negativamente na clivagem das sialofosfoproteínas.

Pessoa *et al.* (2015) avaliaram o efeito do extrato de *A. colubrina* no processo de cicatrização do tecido epitelial de ratos e observaram que o número de fibroblastos e o percentual de colágeno, nos 7º e 14º dias de avaliação, foram mais elevados no grupo tratado com o extrato de *A. colubrina*, quando comparado ao grupo controle. Embora os efeitos biológicos *in vitro* e *in vivo* desse vegetal sejam promissores, antes de indicá-lo como fonte de bioativos na reparação do tecido pulpar, são necessários mais estudos, sobretudo, diretamente em tecidos dentários.

2.4 Polpa dentária e inflamação pulpar

A polpa dentária é um tecido conjuntivo frouxo rico em vasos sanguíneos, fibras nervosas, matriz extracelular e células mesenquimais indiferenciadas (LUO *et al.*, 2018). Esse tecido apresenta características próprias, onde na sua região periférica, estão os odontoblastos, seguidos de uma zona acelular basal e da zona rica em células. Na porção central do conteúdo pulpar observa-se numerosos vasos sanguíneos, fibras nervosas e células imunes e não imunes distribuídas na matriz extracelular, que é de natureza fibrilar e fundamental (HUI *et al.*, 2017; LOPES, 2018; GIRAUD *et al.*, 2019).

O processo cicatricial é comum a todas as feridas, independentemente do agente que a causou, é sistêmico e dinâmico e está diretamente relacionado às condições gerais do organismo. O reparo tecidual pode ser dividido em três fases: (1) fase inflamatória, presente do início da lesão até o 6º dia, (2) fase de formação de tecido de granulação com deposição de matriz extracelular, entre o 4º e 14º dia, e (3) fase de remodelação, que ocorre do 7º ao 17º dia (CLARK, 2005). Contudo, esses eventos celulares e moleculares não devem ser vistos isoladamente, uma vez que as fases do processo inflamatório são sobrepostas temporalmente e modifica-se de acordo com o estado patológico do tecido (CAMPOS *et al.*, 2007). Por outro lado, a polpa dentária é cercada em toda sua extensão por um rígido tecido dentinário o que a diferencia dos demais tecidos do corpo. Essa exclusiva característica dificulta a sua expansão durante um processo inflamatório, resultante de agressões ao complexo dentino-pulpar (JANG *et al.*, 2015).

Diversas situações clínicas podem ocasionar agressões ao complexo dentino-pulpar. Didaticamente, a origem dessas injúrias classifica-se em mecânicas/físicas, químicas e biológicas (GIRAUD *et al.*, 2019). As injúrias biológicas são provocadas por microrganismos e seus produtos, sendo considerados os principais causadores e perpetuadores das alterações pulpares e perirradiculares, desencadeando respostas inflamatórias e imunológicas variadas. Essas agressões microbiológicas sobre o conteúdo pulpar ocasionam, após 32 horas, um acúmulo considerável de infiltrado neutrofílico nas áreas abaixo dos túbulos dentinários expostos, formando microabscessos pulpares. Com 10 dias de exposição às agressões biológicas, observa-se a predominância de células mononucleares e, em média de 30 dias da agressão inicial, observa-se ausência de infiltrado inflamatório e deposição de matriz mineralizada (JANG *et al.*, 2015).

Procedimentos odontológicos invasivos e que gerem aquecimento, materiais capeadores e restauradores, traumatismos dentários e lesões cariosas são exemplo de situações clínicas que podem ocasionar lesões e exposições pulpares, resultando em respostas imunes e inflamatórias, mediadas por eventos moleculares e celulares (HUI *et al.*, 2017; GIRAUD *et al.*, 2019).

Diante de uma agressão pulpar, seja ela física, química ou biológica, inicia-se um gradiente quimiotático com recrutamento de células imunocompetentes por citocinas pró-inflamatórias. Em primeira linha, os odontoblastos e fibroblastos, células mais numerosas da polpa, apresentam Receptores Reconhecedores de Patógenos (RRP), como os receptores do tipo *Toll-like* (JANG *et al.*, 2015; GIRAUD *et al.*, 2019). Os RRP são os principais fatores que iniciam a inflamação via reconhecimento de “padrões moleculares associados a danos” (DAMP’s) e “padrões moleculares associados a patógenos” (PAMP) nas células imunes e não imunes (GIRAUD *et al.*, 2019).

Depois de reconhecer o patógeno por RRP, os odontoblastos regulam uma de suas funções características, que é a síntese da matriz dentinária e, concomitantemente, secretam quimiocinas para recrutar células dendríticas imaturas (CHEN *et al.*, 2019; JANG *et al.*, 2015; COELHO *et al.*, 2019). Além das citocinas, outro componente importante no processo inflamatório é o sistema complemento, que pode ser ativado por células imunes e não imunes, a exemplo dos fibroblastos. A cascata proteolítica pode ser iniciada pela via clássica, via alternativa ou ligadora de manose (GIRAUD *et al.*, 2019). As células imunológicas presentes na polpa dentária produzem proteases, como MMPs, espécies reativas de oxigênio (ERO) e várias enzimas capazes de combater patógenos invasores. Por outro lado, essas moléculas secretadas podem ocasionar danos pulpares irreversíveis (JANG *et al.*, 2015; COELHO *et al.*, 2019).

Os linfócitos T, linfócitos B, macrófagos e seus mediadores químicos são componentes celulares que estão presentes no tecido pulpar normal e, portanto, fazem parte do processo inflamatório inicial, desempenhando importante papel quimiotático. Os linfócitos T, por exemplo, são as células da imunidade celular mais numerosas (SILVA *et al.*, 2009; ALMEIDA *et al.*, 2014). Essas células normalmente localizam-se na periferia dos vasos sanguíneos, atuam na produção de citocinas e interagem com outras células imunocompetentes. Por sua vez, os linfócitos B e plasmócitos, que participam da síntese e secreção de anticorpos, respectivamente, não são frequentes em polpa sadia (ALMEIDA, 2014).

Nos momentos iniciais da agressão pulpar, ocorre um aumento da permeabilidade vascular e migração de leucócitos dos vasos sanguíneos devido à presença de substâncias pró-inflamatórias ou citocinas, a exemplo da IL-1 β e da IL-6, que exercem um papel fundamental no processo inflamatório (SILVA *et al.*, 2009; ALMEIDA, 2014). A IL-1 β é uma das mais importantes interleucinas encontradas na polpa, sendo responsável por uma variedade de ações de mediação das respostas inflamatórias do hospedeiro e é produzida por diferentes células. A IL-6 apresenta atividade pleiotrópica, atuando sobre diferentes células e desempenhando um papel importante como mediadora de reações pró-inflamatórias (ALMEIDA, 2014).

Embora o processo inflamatório seja pré-requisito para o reparo tecidual e eliminação de patógeno, segundo Zanini *et al.* (2017), a inflamação pulpar intensa ou prolongada pode impedir a regeneração tecidual. Desta forma, existe a necessidade de controlar esse processo para garantir o sucesso da terapia pulpar. Assim, um dos grandes desafios inerentes ao sucesso da terapia pulpar, corresponde ao controle do processo inflamatório no tecido pulpar, utilizando terapias pulpares conservadoras, com vistas a sua reparação tecidual, mantendo a vitalidade do dente e aumentando a sua longevidade.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar histologicamente a resposta da polpa dentária de ratos após pulpotomia e proteção pulpar com uma pasta à base de *A. colubrina* e a pasta antibiótica CTZ.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a resposta inflamatória da polpa dentária de ratos após pulpotomia e selamento pulpar com uma pasta à base de *A. colubrina* e a pasta antibiótica CTZ;
- Avaliar a ocorrência da desorganização da polpa dentária de ratos após pulpotomia e selamento pulpar com uma pasta à base de *A. colubrina* e a pasta antibiótica CTZ;
- Avaliar a formação de barreira mineralizada (dentina reparadora) em dentes de ratos, após pulpotomia e proteção do tecido pulpar com uma pasta à base de *A. colubrina* e a pasta antibiótica CTZ;
- Comparar as características histológicas do tecido pulpar de ratos, quando tratado com a pasta à base de *A. colubrina*, a pasta antibiótica CTZ e a pasta de hidróxido de cálcio.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia proposta baseou-se no delineamento experimental do estudo de Esmeraldo *et al.* (2013), que avaliaram a resposta inicial da polpa dental em ratos, após pulpotomia e proteção da polpa dentária com própolis verde, pasta iodoformada e hidróxido de cálcio; como também, nos trabalhos de Lima *et al.* (2011) e Prabhakar *et al.* (2019), os quais utilizaram um modelo experimental semelhante, diferenciando os materiais.

4.1 Caracterização do estudo

Essa pesquisa é caracterizada como estudo experimental *in vivo*, com análises morfológicas do tecido pulpar de ratos, frente à utilização de uma pasta à base de *A. colubrina* e da pasta antibiótica CTZ, como materiais de proteção pulpar, após pulpotomia.

4.2 Considerações Éticas

O delineamento dessa pesquisa atendeu aos princípios éticos publicados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi provado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro Universitário Facisa (UNIFACISA), em Campina Grande, Paraíba (ANEXO 1). Todo procedimento foi supervisionado por uma Médica Veterinária responsável pelo biotério, assegurando que não houve sofrimento ou angústia animal durante os procedimentos que foram executados. Para controle da dor, assegura-se que os animais foram devidamente anestesiados, bem como a eutanásia pós-experimento ocorreu por métodos indolores, conforme descrito na seção 4.7 deste trabalho.

Os pesquisadores envolvidos nessa pesquisa assumem integralmente a responsabilidade ética e moral durante os experimentos, reconhecendo ser primordial manter posturas de respeito ao animal, como ser vivo e pela contribuição científica que ele proporciona (Princípios éticos para o uso de animais revisados pela CIOMS/ICLAS, 2012).

Em respeito à Lei da Biodiversidade 13.123/2015 e por se tratar de uma pesquisa que se apropriou de um material vegetal originário da biodiversidade brasileira, realizou-se previamente o cadastro de acesso na plataforma SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético), sob o nº A81E8A5.

4.3 Coleta do material vegetal

O material vegetal (casca) da *A. colubrina* (FIGURA 1) foi coletado no mês de setembro no ano de 2011, na cidade de Queimadas, localizada geograficamente no Planalto da Borborema, Paraíba, região Nordeste do Brasil (7° 22 '25" S, 35° 59' 32" W), que faz parte do bioma caatinga. Um espécime representativo foi depositado no Herbário Manuel de Arruda Câmara, da Universidade Estadual da Paraíba, sob o número 1936/ACAM.

Figura 1 – Ilustração da remoção da casca do caule da *Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan.



4.4 Preparação do extrato de *A. colubrina*

Após a coleta do material vegetal, a casca foi desidratada, macerada, umedecida e imersa em etanol a 80% (100g/250 mL) por 48h em temperatura ambiente. Posteriormente, o material foi filtrado e os resíduos foram imersos em 80% de álcool etílico. As três fases finais de extração foram concentradas à vácuo, em evaporador rotativo, liofilizadas e armazenadas a -20°C.

4.5 Modelo animal e ambiente de experimentação

Foram utilizados 07 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus albinus*), pesando entre 250 e 400g, livres de cárie e devidamente saudáveis, provenientes do biotério do Centro Universitário Facisa (UNIFACISA), localizado na cidade de Campina Grande, Paraíba. Os

experimentos ocorreram mediante a aprovação da referida instituição. Os animais permaneceram em gaiolas plásticas de polipropileno, forradas com maravalha autoclavada, em ambiente controlado com temperatura de aproximadamente 22°C, umidade em torno de 60%, ciclo de luz 12 horas claro/escuro, recebendo água e ração sem restrição.

4.6 Grupos de animais e preparação dos materiais

Os animais foram alocados em grupos de acordo com o material utilizado para proteger o tecido pulpar remanescente após a pulpotomia e período de avaliação. Foram considerados dois tempos de avaliação, com nove animais para cada tempo. Um animal foi alocado para o grupo sem intervenção, a fim de estabelecer o padrão histológico. Um total de 18 primeiros molares (superiores e inferiores) foram pulpotomizados e protegidos com um dos três materiais do estudo, sendo 03 dentes para cada medicação, conforme descrito no Quadro 2.

O extrato liofilizado de *A. colubrina* foi manipulado com óxido de zinco em uma concentração de 50% (QUADRO 2). Considerando que a área da cavidade realizada nos primeiros molares dos ratos comporta aproximadamente 1 mg da manipulação, tem-se um volume de 0,5 mg de extrato em contato com o tecido pulpar dos ratos.

Quadro 2 – Distribuição dos grupos de acordo com o material utilizado e o tempo de avaliação.

Pastas	72 horas	15 dias
Extrato <i>A. colubrina</i> + óxido de zinco (1:1) + polietilenoglicol 400	03 dentes	03 dentes
Hidróxido de cálcio P.A. + polietilenoglicol 400	03 dentes	03 dentes
Pasta CTZ à base de cloranfenicol 500 mg + tetraciclina 500 mg + óxido de zinco (1:1:2) + eugenol	03 dentes	03 dentes
Sem intervenção – Padrão histológico	04 dentes	-
Número de animais	04	03

4.7 Procedimentos anestésicos e operatórios

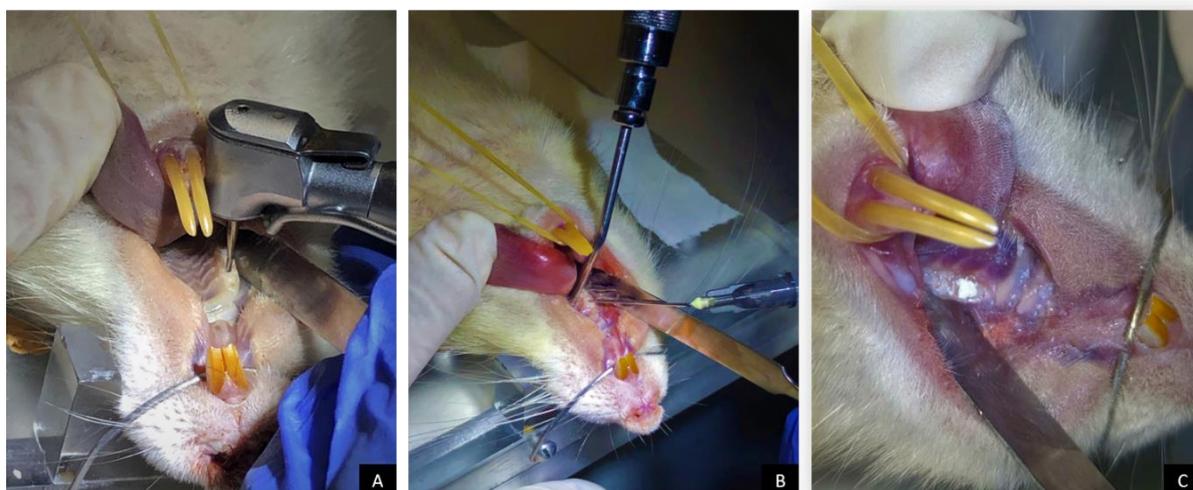
Inicialmente os animais receberam injeção intraperitoneal de cloridrato de xilazina 2% (6mg/kg) e cloridrato de cetamina 10% (10/30mg/kg) (Cetamin/Xilazin - Rhobibarme Indústria Farmacêutica Ltda, Hortolândia, SP, Brazil).

Os animais foram imobilizados em mesa cirúrgica adequada, em decúbito dorsal, para acesso aos molares superiores e inferiores. O acesso cirúrgico à câmara pulpar foi realizado na superfície oclusal com haste carbide de formato piriforme FG 330 (KG Sorensen, São Paulo, Brasil), em contra ângulo de baixa rotação. Todo procedimento foi realizado sob refrigeração com solução fisiológica estéril 0,9%. A irrigação da cavidade foi realizada com cloreto de sódio 0,9 % e secagem com cone de papel absorvente estéril (Dentsply - Indústria e Comércio Ltda, Petropólis, RJ, Brazil).

Após a manipulação imediata, aproximadamente 1mg das pastas especificadas no quadro 2 foram aplicadas na câmara pulpar, sobre a polpa exposta, com auxílio de um aplicador de hidróxido de cálcio infantil e um cone de papel absorvente estéril. As cavidades foram seladas com cimento de óxido de zinco e eugenol (IRM, Dentsplay - Indústria e Comércio Ltda, Petropólis, RJ, Brazil).

Os animais foram mantidos em gaiolas sob condições ambientais adequadas, com livre acesso de ração e água durante todo o experimento, até o dia da eutanásia. Após o período de experimentação, os animais foram eutanasiados por meio da inalação do anestésico inalável Isoflurano 1mL/mL (Isoforine – Cristália produtos químicos farmacêuticos Ltda, Itapira, São Paulo, Brasil), e a confirmação da eutanásia foi realizada pela verificação da ausência de sinais vitais.

Figura 2 – Sequência dos procedimentos operatórios com o animal sedado. (A) Abertura coronária e exposição pulpar; (B) irrigação com solução fisiológica 0,9% e aspiração; (C) selamento da cavidade com cimento de óxido de zinco e eugenol.



4.8 Análises macroscópica dos espécimes

As maxilas e mandíbulas dissecadas foram analisadas, por inspeção visual e tátil, quanto a integridade da restauração provisória após o tempo de experimentação. Os dentes com ausência da restauração provisória ou com fraturas coronárias que pudessem comprometer as análises microscópicas não foram incluídos no estudo e foram descartados.

4.9 Preparação dos espécimes e análise histomorfológica

O processamento histológico e análises microscópicas foram realizadas no Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba.

Os espécimes foram fixados em solução de formalina a 10% por aproximadamente 96 horas, seguida de desmineralização em solução de ácido etilenodiamino tetra-cético (EDTA), tamponado com fosfato e pH ajustado em 7,34, o qual foi trocado a cada 7 dias até o prazo máximo de desmineralização em 14 e 21 dias para maxilas e mandíbulas, respectivamente. A desmineralização foi considerada satisfatória quando a peça não oferecia resistência à perfuração com agulha de insulina. Posteriormente a desmineralização, o material foi clivado e enviado para processamento histológico, considerando a seguinte metodologia: lavagem em água corrente por 40 min, desidratação em álcool 70°GL e álcool 80°GL por 40 min, imerso em solução de álcool etílico absoluto e butílico (1:1) por 30 min, imerso em álcool butílico por 30 min, duas imersões em xilol por 10 min, três banhos em parafina por 30 min e inclusão em parafina.

Posteriormente, cortes de 5 µm foram obtidos em um micrótomo (Leica RM 2125 RTS - Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), estendidos em lâminas de vidro e corados com hematoxilina e eosina (HE). Sob microscopia de luz (Leica DM 500 – Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), um examinador previamente treinado realizou as análises das lâminas histológicas. Com base em adaptações dos parâmetros descritos no manual da Organização Internacional de Padronização (ISO) N° 10993/7405 e no trabalho de LIU *et al.* (2017), conforme apresentado nos quadros 3, 4 e 5, foram analisados os seguintes aspectos: infiltrado inflamatório, desorganização do tecido pulpar e formação de dentina reparadora

Quadro 3 – Escores e caracterização do infiltrado inflamatório presente no tecido pulpar.

Escores	Infiltrado inflamatório
0	Nenhuma ou poucas células inflamatórias dispersas na região pulpar
1	Infiltrado inflamatório celular discreto com leucócitos polimorfonucleares e mononucleares
2	Infiltrado inflamatório celular moderado
3	Infiltrado inflamatório celular intenso ou com características de abscesso

Fonte: ISO 10993/7405; LIU *et al.* (2017).

Quadro 4 – Escores e caracterização da desorganização do tecido pulpar.

Escores	Desorganização do tecido pulpar
0	Tecido normal
1	Desorganização da camada odontoblástica, mas tecido pulpar central normal
2	Desorganização total da morfologia do tecido pulpar
3	Necrose pulpar

Fonte: ISO 10993/7405; LIU *et al.* (2017).

Quadro 5 – Escores e caracterização da formação de dentina reparadora.

Escores	Dentina reparadora
0	Ausente
1	Deposição discreta de tecido duro imediatamente abaixo da região exposta
2	Deposição moderada de tecido duro imediatamente abaixo da região exposta
3	Deposição intensa de tecido duro imediatamente abaixo da região exposta, característica de uma ponte de dentina completa

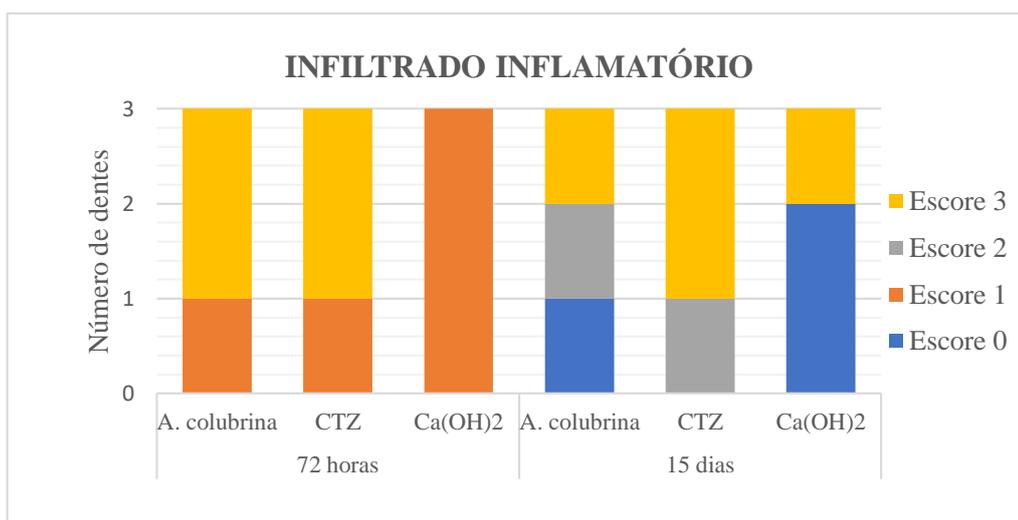
Fonte: ISO 10993/7405; LIU *et al.* (2017).

5 RESULTADOS

A amostra foi composta por 18 primeiros molares, superiores e inferiores, de ratos, randomizados igualmente em 3 grupos, de acordo com o material e dois tempos de avaliação (Quadro 2). As análises morfométricas do tecido pulpar incluíram a intensidade do infiltrado inflamatório (Gráfico 1), a desorganização do tecido pulpar (Gráfico 2) e a formação de conteúdo mineralizado (Gráfico 3).

No tempo de 72 horas, a maioria das amostras dos grupos da pasta da *A. colubrina* e da pasta CTZ apresentaram intenso infiltrado inflamatório com células polimorfonucleares e mononucleares. Já nas amostras tratadas com hidróxido de cálcio prevaleceu um infiltrado inflamatório discreto. No tempo de 15 dias, as amostras tratadas com a pasta à base de *A. colubrina* e com a pasta de hidróxido de cálcio apresentaram redução da intensidade do infiltrado inflamatório. Por outro lado, as amostras tratadas com a pasta CTZ não revelaram nenhum sinal de remissão do processo inflamatório, com áreas indicativas de abscesso (GRÁFICO1).

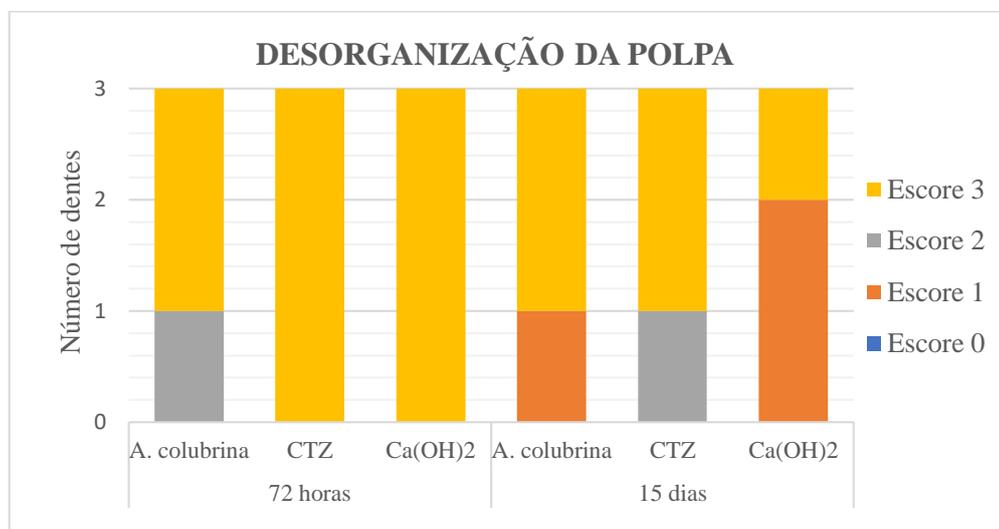
Gráfico 1 – Representação gráfica dos resultados da intensidade do infiltrado inflamatório, distribuídos de acordo com as pastas testadas, escores e tempos de avaliação.



A desorganização do conteúdo pulpar foi observada em todas as amostras e em ambos os tempos de avaliação, com áreas de necrose em pelo menos um campo do tecido pulpar avaliado (escore 3). As amostras tratadas com a pasta à base de *A. colubrina* apresentaram menos casos de necrose pulpar, na avaliação de 72 horas. No 15º dia de avaliação, apenas nas amostras tratadas com a pasta à base de *A. colubrina* (n=1) e com a pasta de hidróxido de cálcio (n=2) observou-se a manutenção da normalidade da porção central do tecido pulpar, apesar da desorganização da camada odontoblástica. As amostras

tratadas com a pasta CTZ revelaram extensas áreas de necrose, nos dois tempos de avaliação (GRÁFICO2).

Gráfico 2 – representação gráfica dos resultados da desorganização da polpa distribuídos de acordo com as formulações testadas, escores e tempos de avaliação.



Em relação a deposição de tecido mineralizado, formando uma barreira na área da exposição pulpar, nenhuma pasta testada foi capaz de induzir a formação de tecido mineralizado, no período de 72 horas. Em relação a variável formação de dentina reparadora, apenas as amostras tratadas com a pasta à base de *A. colubrina* e a pasta de hidróxido de cálcio foram capazes de induzir a formação de tecido mineralizado (FIGURA 3), no 15º dia, em pelo menos um dos condutos radiculares avaliados, com diferentes intensidades de deposição (GRÁFICO 3).

Gráfico 3 – Representação gráfica dos resultados da formação de dentina reparadora distribuídos de acordo com as formulações testadas, escores e tempos de avaliação.

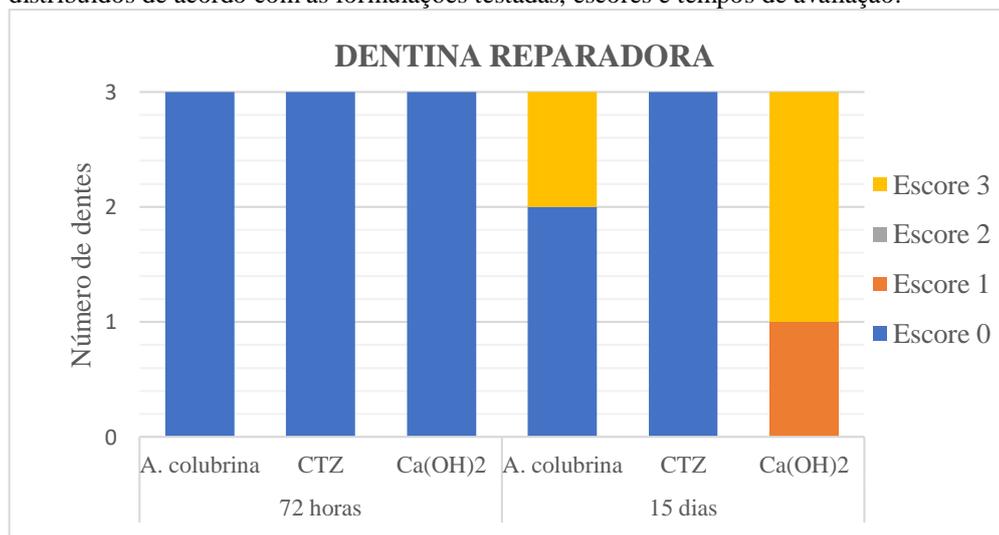


Figura 3 – Fotomicrografias representativas do tecido pulpar de dentes molares de ratos, após pulpotomia e proteção pulpar com as pastas à base de *A. colubrina*, CTZ e hidróxido de cálcio, nos períodos experimentais de 72 horas e 15 dias de avaliação, além do corte histológico de um dente molar de rato sem intervenção (padrão histológico).

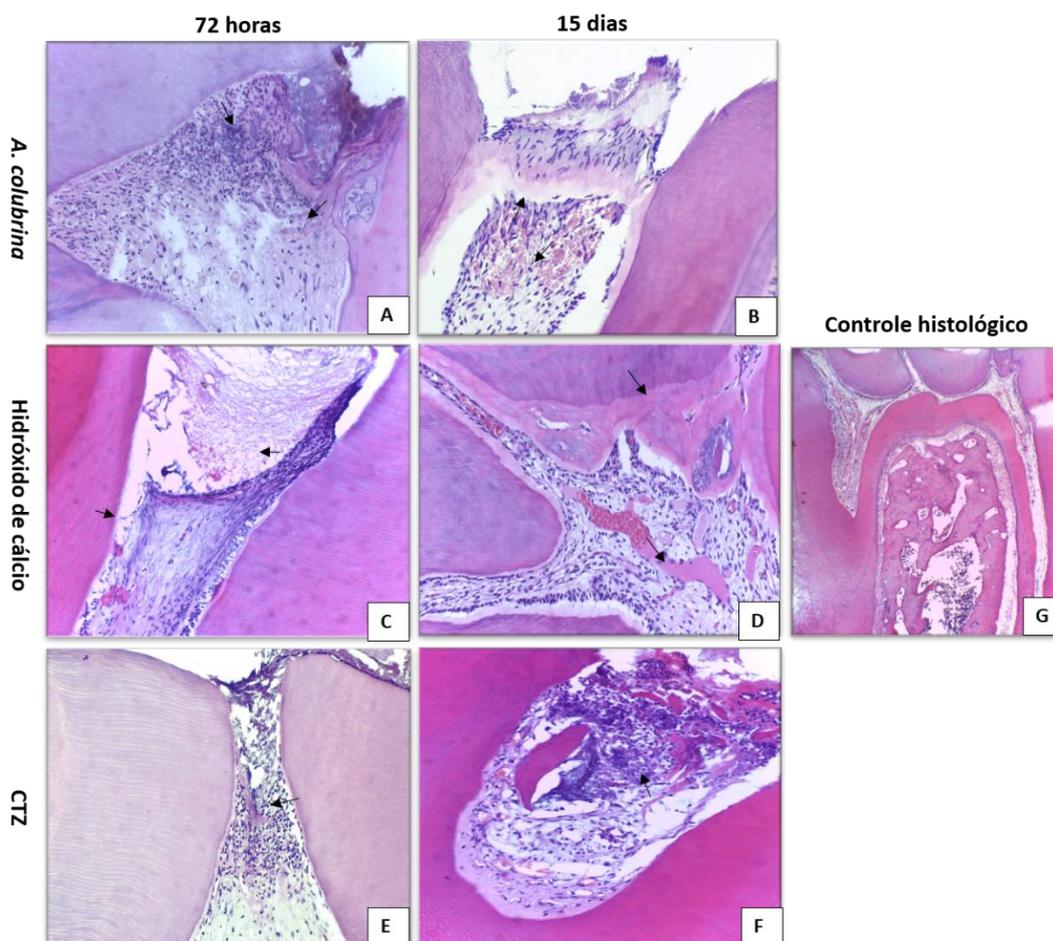


FIGURA A - Observa-se a presença de um intenso infiltrado inflamatório neutrofílico próximo à área de amputação da polpa (HE, 200x). FIGURA B - Deposição de conteúdo mineralizado obliterando a entrada de um dos condutos, associado a hiperemia e extravasamento hemorrágico (HE, 200x). FIGURA C - desorganização do conteúdo pulpar com áreas de tecido necrótico abaixo da região de exposição e na porção cervical de um dos condutos (HE, 200x). FIGURA D - Presença de dentina reparadora e de vasos sanguíneos abaixo da área do tecido neoformado (HE, 200x). FIGURA E - Infiltrado inflamatório celular intenso justaposto a área de necrose pulpar próximo à região de exposição (HE, 200x). FIGURA F - Infiltrado inflamatório neutrofílico com características de abscesso e desorganização da morfologia do tecido pulpar próximo à região exposta (HE, 200x). FIGURA G - Fotomicrografia do controle histológico evidenciando a morfologia do complexo dentino-pulpar sem alterações (HE, 40x).

6 DISCUSSÃO

Este estudo foi desenvolvido considerando o debate sobre as diferentes propostas terapêuticas para pulpotomia em dentes decíduos (ESMERALDO *et al.*, 2013; ALAGL *et al.*, 2017; SAIKIRAN *et al.*, 2019; GAWAD *et al.*, 2020; RAO *et al.*, 2020), as respectivas limitações dos materiais disponíveis (TAYLOR *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2020; ABUELNIEL *et al.* 2020) e a necessidade de esclarecer os fenômenos teciduais da polpa dentária, em resposta a parte dos materiais já utilizados na clínica para a proteção pulpar após pulpotomia. Objetivou-se analisar a resposta do tecido pulpar de ratos após pulpotomia e proteção pulpar com uma pasta à base de *A. colubrina* e a pasta CTZ, utilizando como controle, a pasta de hidróxido de cálcio.

A escolha do extrato da *A. colubrina* para compor uma das pastas baseou-se em estudos prévios, que caracterizaram os seus potenciais anti-inflamatório, antioxidante, antimicrobiano, e conferiram baixa toxicidade (LIMA *et al.*, 2014; NUNES, 2011; ROCHA, 2014; PESSOA *et al.*, 2015; SILVA *et al.* 2019; MAIA – dados não publicados). A pasta CTZ apesar de ser bastante utilizada na Odontopediatria, em pulpotomias de dentes decíduos (LOCATIVA *et al.*, 2012; LUENGO-FEREIRA *et al.*, 2019), não foi encontrado Nenhum estudo na literatura, que demonstre a resposta do tecido pulpar frente a esta pasta, nos períodos iniciais do processo inflamatório.

A pasta à base de *A. colubrina* e a pasta CTZ induziram intenso infiltrado inflamatório celular, com sinais de abscesso no período de 72 horas. Com o decorrer do tempo (15 dias), observou-se nas amostras tratadas com a pasta à base de *A. colubrina* redução da intensidade do infiltrado inflamatório, com sinais de deposição de tecido mineralizado, compatível com dentina reparadora. Por outro lado, nas amostras tratadas com o CTZ não foi observada nenhuma remissão do processo inflamatório. Pelo contrário, a intensidade do infiltrado inflamatório foi maior, sem nenhuma evidência de reparo tecidual.

A remissão do processo inflamatório no grupo tratado com a pasta à base de *A. colubrina* pode ser do seu efeito modulador sobre a resposta inflamatória do hospedeiro através da infra-regulação da expressão gênica de IL-8 e da supra-regulação do gene IL-10. Além de reduzir, significativamente a nível celular (fibroblastos humanos gengivais), a expressão de IL-6 e IL-8, sugerindo uma possível modulação na secreção de enzimas pró-inflamatórias pelo hospedeiro (MAIA - dados não publicados).

Essa interação do extrato de *A. colubrina* com mediadores inflamatórios foi observada no estudo realizado por Cardoso-Junior *et al.* (2020), onde observou-se uma redução na

produção de IL-12 e, adicionalmente, o extrato aumentou a produção de IL-10, reduziu o edema em pata de ratos e leucocitose. Os autores atribuíram esses achados aos fitoconstituintes presentes no vegetal, nomeadamente, os flavonoides.

A organização do tecido pulpar, no período de 72 horas, nos dentes tratados com a pasta à base de *A. colubrina* pode ter sido superior aos demais grupos (Gráfico 2) em decorrência dos seus compostos bioativos, como as proantocianidinas. Esses compostos apresentam ação sobre enzimas proteolíticas zinco dependentes, como as MMPs e, conseqüentemente, promovem a biomodificação do colágeno dentinário, aumentando a resistência desta molécula à degradação enzimática (SOUZA *et al.*, 2018).

As MMPs são proteases que participam, dentre outras funções, do processo de clivagem das sialofosfoproteínas dentinárias em fosfoproteínas e sialoproteínas dentinárias, que possuem um importante papel na formação e mineralização da pré-dentina (SUZUKI *et al.*, 2009; RITHCIE *et al.*, 2018). No entanto, outros estudos são necessários para verificar se os compostos bioativos presentes no extrato da casca da *A. Colubrina* podem regular negativamente ou positivamente essas proteases e influenciar direta ou indiretamente na deposição de conteúdo mineralizado.

O potencial terapêutico do extrato de *A. colubrina* é atribuído a sua complexa composição química, constituída por diversos subprodutos derivados do seu metabolismo secundário, especialmente, os flavonoides, taninos e procianidinas. Esses compostos são conhecidos por facilitar a reparação e cicatrização de feridas (LIMA *et al.*, 2014; PESSOA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2019; CARDOSO-JUNIOR *et al.*, 2020). Rocha *et al.*, (2014) avaliaram o perfil fitoquímico do extrato da casca de *A. Colubrina* utilizado neste estudo, onde foram identificados teores elevados de compostos fenólicos e flavonoides e, em menor proporção, os taninos. Em seguida, a caracterização fitoquímica realizada por LIMA *et al.* (2014) revelou diferentes compostos químicos, com alto teor de polifenóis (53,18%), e taninos (8,77%).

Não há registros na literatura de estudos que avaliaram a resposta do tecido pulpar frente ao extrato de *A. colubrina*. Contudo, Pessoa *et al.* (2015) avaliaram a reparação de tecido epitelial de ratos após tratamento com o extrato de *A. colubrina*. Morfologicamente, observou-se a presença de fibroblastos maiores e maior concentração de fibras colágenas, com aumento quantitativo e qualitativo no 7º e 14º dias, quando comparado ao grupo controle proervação.

A viabilidade celular frente ao extrato de *A. colubrina* foi comprovada por diferentes estudos (GUARNIERE *et al.*, 2019; CARDOSO-JUNIOR *et al.*, 2020). Resultados do estudo de MAIA (dados não publicados) apontam que concentrações até 250 µg/mL do extrato de *A. colubrina* mantêm a viabilidade celular de fibroblastos gengivais humanos acima de 70%, com determinação da dose letal (DL₅₀) em 432,3 µg/mL. A concentração do extrato de *A. colubrina* presente na pasta inserida na câmara pulpar correspondeu a aproximadamente 500 µg/mL, sendo, portanto, considerada uma dose segura, apesar das limitações em determinar a concentração real inserida na cavidade.

Nesta pesquisa, a pasta antibiótica CTZ foi o material que obteve o pior desempenho na avaliação de 72 horas e 15 dias do procedimento e nenhuma amostra avaliada apresentou a formação de conteúdo mineralizado. Este achado corrobora com o estudo de Bruno *et al.* (2006), que também não constatou a formação de barreira mineralizada, após pulpotomia em dentes de cães. Os resultados histológicos não são condizentes com as taxas de sucesso clinicorradiográfico (LUENGO-FEREIRA *et al.*, 2019), onde uma degeneração pulpar subclínica, sem diagnóstico, pode estar em desenvolvimento. Apesar dos excelentes resultados clínicos encontrados Luengo-Ferreira *et al.* (2019) alertaram que a utilização do CTZ sobre polpa vital não é totalmente elucidada e que os riscos de reações alérgicas devem ser considerados.

Os indesejados achados histológicos encontrados nas amostras tratadas com a pasta CTZ, provavelmente, são decorrentes da presença do eugenol. O eugenol pode ser considerado um agente citotóxico, quando em contato direto com o tecido pulpar (LEE *et al.*, 2017; JUNG *et al.*, 2018). As moléculas de eugenol são pequenas e podem se difundir facilmente no tecido pulpar, agindo como irritante e causando uma inflamação crônica (LOPES *et al.*, 2019).

No estudo realizado por Bruno *et al.* (2007), os efeitos da pasta CTZ foram analisados sobre polpa viva de cães, com análises histológicas após 6, 8, 9 e 10 meses do procedimento. Os resultados do estudo evidenciaram que mesmo após 6 meses da realização do procedimento, foram observadas características de progressão da inflamação pulpar, com evidência de vasos sanguíneos congestos, áreas hemorrágicas e a presença de células linfocitoplasmáticas inflamatórias. No 8º e 9º mês o processo inflamatório foi parcialmente reduzido, desaparecendo completamente no 10º mês de avaliação. Apesar de apresentar uma resposta pulpar prolongada, os autores concluíram que os resultados das análises histopatológicas realizadas em dentes de cães após pulpotomia com a pasta antibiótica CTZ eram promissores, indicando a sua utilização em terapias pulpares.

Até onde esgotaram-se as buscas por trabalhos científicos para realização desta obra, nenhum estudo encontrado avaliou a reposta pulpar, após pulpotomia e selamento com a pasta antibiótica CTZ, nos períodos de avaliação de 72 horas e 15 dias. Zanini *et al.* (2017) e Lopes *et al.* (2019) consideram importante realizar estudos que busquem compreender a reposta inflamatória da polpa após aplicação de agentes de cobertura, uma vez que a resposta inflamatória inicial exacerbada pode causar necrose tecidual mais profunda.

Locativa *et al.* (2012) avaliaram a resposta inflamatória da sínfise mandibular de porquinhos da índia após a colocação de implantes intraósseos com materiais indicados em terapias pulpares em dentes decíduos. Os autores observaram que a pasta CTZ e pasta à base de hidróxido de cálcio induziram inflamação grave, com a presença marcante de tecido necrótico, linfócitos, células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho e reabsorção óssea. Neste estudo, características semelhantes foram encontradas no tecido pulpar dos dentes tratados com a pasta CTZ, conforme observado nos gráficos 1 e 2, exceto a reabsorção óssea e a presença de células de corpo estranho.

Os achados histológicos deste estudo, nos dois tempos de avaliação, comprovam que o hidróxido de cálcio comporta-se como um material biocompatível, capaz de induzir o reparo do tecido pulpar, com deposição de tecido mineralizado, semelhante a dentina reparadora, dentro de um período de 15 dias, em molares de ratos. O hidróxido de cálcio foi eleito como material padrão ouro nesta pesquisa, justificado pelo seu sucesso clínico e radiográfico constatados ao longo de anos por meio de diversos estudos clínicos, revisões sistemáticas e metanálises (AKCAY *et al.*, 2014; YILDIZ; TOSUN, 2014; CARUSO *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2019).

Oliveira *et al.* (2013) realizaram um estudo com acompanhamento clínico, radiográfico e histológico, cujo resultados revelaram falhas clínicas e radiográficas ao longo do período de estudo no grupo tratado com hidróxido de cálcio, com observação frequente de áreas necróticas nos canais radiculares e reabsorção interna. O tecido dentinário neoformado pelo hidróxido de cálcio pode apresentar defeitos em túneis e porosidades em função da sua alta solubilidade e baixa adesão (GANDOFI *et al.*, 2015; PAULA *et al.*, 2020). Esses diferentes defeitos na dentina reparadora podem funcionar como nichos para acúmulo de microrganismos (AKHLAGHI *et al.*, 2015; GANDOFI *et al.*, 2015). Por outro lado, sabe-se que a presença de matriz mineralizada é um forte indicativo de vitalidade pulpar e ratifica o sucesso do biomaterial. Quando o tecido pulpar é exposto ao ambiente externo, a dentinogênese reparadora pode ser induzida por capeamento pulpar, para manter a vitalidade

e a função do tecido pulpar (PAULA *et al.*, 2020; BOSSÙ *et al.*, 2020). Acredita-se que as falhas associadas ao hidróxido de cálcio podem estar relacionadas à polpa inflamada não diagnosticada e, não necessariamente, ocasionadas pelo material (PORDEUS *et al.*, 2014; STRINGHINI-JUNIOR *et al.*, 2015).

No estudo de Esmeraldo *et al.* (2013) observou-se no tecido pulpar de molares de ratos, após pulpotomia e proteção pulpar com hidróxido de cálcio, intenso infiltrado inflamatório, no período de 72 horas, com declínio gradual no 7º dia de avaliação. Já nos cortes histológicos deste estudo, foi observada a presença discreta de células inflamatórias próximas a área de exposição no período de 72 horas. Esta diferença pode ser em função do veículo utilizado para manipular a pasta de hidróxido de cálcio. No estudo de Esmeraldo *et al.* (2013) foi utilizado um veículo aquoso, a solução salina, e neste estudo foi utilizado um veículo viscoso, o PEG 400. A liberação dos íons cálcio e hidróxila presentes nas formulações à base de hidróxido de cálcio é mais rápida e intensa, quando este material é manipulado com veículos aquosos, como a solução salina e outros líquidos biológicos. No entanto, quando manipulado com veículos viscosos, a exemplo do PEG, a liberação dos íons ocorre de maneira gradual e significativa, refletindo diretamente na resposta tecidual (COSTA E SILVA *et al.*, 2019).

A necrose pulpar observada nas amostras tratadas com a pasta de hidróxido de cálcio, no período de 72 horas, provavelmente é decorrente da alcalinidade deste composto. Esta alcalinidade tem um efeito benéfico ao tecido pulpar lesionado por ser responsável pela ação antimicrobiana desse material e por ocasionar uma irritação superficial e de curta duração, estimulando o tecido conjuntivo a defender-se dos agentes irritantes e reparar-se dos danos causados (ESMERALDO *et al.*, 2013). Outrossim, a necrose superficial ocasionada pelo hidróxido de cálcio funciona como um importante agente quimiotático, estimulando o recrutamento e diferenciação de células imunocompetentes (SILVA *et al.*, 2015; SARAIVA *et al.*, 2017).

Nenhum grupo avaliado nesse estudo apresentou formação de matriz mineralizada na avaliação de 72 horas, o que difere dos achados histológicos do trabalho de Liu *et al.* (2017), onde a avaliação histomorfológica revelou a formação de uma leve camada de dentina sobre a polpa, nos dentes tratados com o hidróxido de cálcio. Este achado é raro em um intervalo de tempo tão curto (MENDONÇA *et al.*, 2009; LOPES *et al.*, 2019). Isso porque a fase de coagulação geralmente ocorre em até 24 horas, dependendo da ferida gerada e do estado patológico do tecido, e a fase inflamatória, marcada pela intensa produção de mediadores

inflamatórios e eventos celulares, normalmente perdura por até 6 dias do início da lesão (BALBINO *et al.*, 2005; MENDONÇA, 2009). A reparação celular tem início após o controle do processo inflamatório, com a substituição da parte lesionada ou necrótica por células mesenquimais indiferenciadas, que após diferenciação dão origem a um tecido semelhante ao anterior.

Em relação a escolha do modelo animal para a realização deste estudo, utilizou-se o modelo com mamíferos roedores, uma vez que os molares de ratos apresentam semelhanças com os molares humanos em termos de características anatômicas, histológicas e biológicas (TRONGKIJ *et al.*, 2018; CARUSO *et al.*, 2018). Constatou-se que as reações biológicas do tecido pulpar de ratos, nos diferentes estágios do processo inflamatórios, são equiparáveis a outros mamíferos (PAULA *et al.*, 2020).

A extrema dificuldade para realização de isolamento absoluto, a remoção completa de debris oriundos do desgaste dentário e a limitação na visualização do campo operatório podem ter influenciado indiretamente a resposta inflamatória. Tais fatores devem ser considerados ao avaliar o efeito das medicações sobre o tecido pulpar de ratos (LOPES *et al.*, 2019). O uso desse modelo animal reduz expressivamente a exposição e eutanásia de animais de grande porte, como mamíferos não roedores, além das notórias vantagens éticas e econômicas (LOPES *et al.*, 2019).

Apesar de algumas limitações, como número amostral reduzido e tempo de avaliação relativamente curto, os resultados encontrados nesta pesquisa contribuem expressivamente para o conhecimento dos eventos celulares envolvidos no processo inflamatório após pulpotomia e proteção pulpar, além de subsidiar o desenvolvimento de estudos futuros em terapias pulpares vitais de dentes decíduos e, especialmente, com a utilização de produtos naturais como fonte de recursos terapêuticos em Odontologia.

Outra limitação refere-se à definição exata da concentração do extrato da *A. colubrina* inserida na pasta. Pretende-se desenvolver uma formulação, que padronize a concentração do extrato, considerando as doses seguras em relação aos dados de citotoxicidade obtidos em macrófagos (LIMA *et al.*, 2018), fibroblastos gengivais humanos (MAIA-dados não publicados) e de toxicidade sistêmica (SILVA *et al.*, 2019), assim como, as concentrações que apresentam efeito modulador sobre a resposta inflamatória do hospedeiro (MAIA-dados não publicados).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao analisar integralmente as variáveis morfológicas investigadas nesse estudo, pode-se afirmar que nenhuma pasta testada apresentou resultados iguais ou melhores do que aqueles obtidos com a pasta à base de hidróxido de cálcio, em relação a atividade anti-inflamatória e reparadora no tecido pulpar de molares de ratos.

Apesar do pioneirismo desse estudo em avaliar a ação da uma pasta à base de *A. colubrina* sobre o tecido pulpar, considera-se que os resultados encontrados são promissores, entretanto, novas análises e estudos que avaliem os fenômenos inflamatórios e de reparo da polpa dentária frente à aplicação de formulações padronizadas à base desse vegetal são necessárias.

REFERÊNCIAS

ABUELNIEL, G. M.; DUGGAL M.S.; KABEL N.R. A comparison of MTA and biodentine as medicaments for pulpotomy in traumatized anterior immature permanent teeth: a randomized clinical trial. **Dent. Traumatol.**, v. 25, p.1-28, 2020.

AGUILAR, P.; LINSUWANONT, P. Vital pulp therapy in vital permanent teeth with cariously exposed pulp: a systematic review. **J. Endod.**, v.37, n.5, p.581-587, 2011.

AKCAY, M.; SARI, S. The effect of sodium hypochlorite application on the success of calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate pulpotomies in primary teeth. **Pediatric Dentistry.**, v.36, n.4, p.316–21, 2014.

AKHLAGHI, N.; KHADEMI, A.K. Outcomes of vital pulp therapy in permanent teeth with different medicaments based on review of the literature. **Dent. Res. J.**, v. 12, p. 406-17, 2015.

ALAGL, A.S. *et al.* Phytosolutions for *Enterococcus faecalis* in endodontics: an in vitro study. **J. Int. Oral Health.**, v.7, n.6, p.97-102, 2015.

AL-DLAIGAN, Y. H. Pulpotomy medicaments used in deciduous dentition: An update. **J. Contemp. Dent. Pract.**, v.16, n.6, p.486–503, 2015.

ALMEIDA, L.H.S. Influência da gestação no processo inflamatório da polpa dentária frente à agressão: estudo experimental em ratos. 78f. 2014. **Dissertação (Mestrado)** – Programa de Pós-graduação em Odontopediatria, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

ALOLOF, H. *et al.* Clinical and radiographical evaluation of propolis and thymus vulgaris extracts compared with formocresol pulpotomy in human primary molars. **BDJ Open.**, n.16005, 2016.

ATASEVER, G. *et al.* Primary molar pulpotomies with different hemorrhage control agents and base materials: a randomized clinical trial. **Nig. J. Clinic. Practi.**, v.22, n.3, p. 305-312, 2019.

AWAWDEH, L. *et al.* Outcomes of vital pulp therapy using mineral trioxide aggregate or biodentine: a prospective randomized clinical trial. **J. Endod.**, v.44, n.11, p.1603 – 1609, 2018.

BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.**, v. 41, n. 1, 2005.

BANIHANI, A; DERRY, C.; TOUMBA, J.; DUGGAL, J. Effectiveness, costs and patient acceptance of a conventional and a biological treatment approach for carious primary teeth in children. **Caries Res.**, v. 53, n. 1, p. 65–75, 2019.

BARRETO, H.M. *et al.* Enhancement of the antibiotic activity of aminoglycosides by extracts from *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *Cebil* against multi-drug resistant bacteria. **Nat. Prod. Res.**, v.30, n.11, p.1289-92, 2016.

BARROS, E. V. R.; NERES, S. D. A. Terapia pulpar em dentes decíduos utilizando pasta de CTZ composta de clorafenicol, tetraciclina e óxido de zinco e eugenol: uma revisão de literatura. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Recife/PE: Faculdade Integrada de Pernambuco., 2017.

BJØRNDAL, L.; SIMON, S.; TOMSON, P.L.; DUCAN, H.F. Management of deep caries and the exposed pulp. **International Endodontic Journal.**, v. 52, p. 949–973, 2019.

BRITO, A.C.M.; BEZERRA, I.M.; CAVALCANTE, D.F.B. *et al.* Dental caries experience and associated factors in 12-year-old-children: a population based-study. **Braz. Oral Res.** v. 34, p. e010, 2020.

BRUNO, G.B.; MENEZES, V.A.; BRUNO, J.A.; ALMEIDA, M.W.; VIANA, G.S.B. Hematological and biochemical evaluations of blood from dogs submitted to pulpotomies with an antibiotic sealer. **Rev. Odontol. UNESP.**, v. 35, n. 3, p. 125-133, 2006

_____. *et al.* Biocompatibility evaluation of an antibiotic paste after pulpotomy in dogs. **Braz J. Oral Sci.**, v. 6, n. 22, p. 1397-1401.

BOSSÙ, M. *et al.* Different pulp dressing materials for the pulpotomy of primary teeth: a systematic review of the literature. **J. Clin. Med.**, v. 9, n. 838, p. 2-23, 2020.

CAMPOS, A.C.L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A.K. Cicatrização de feridas. **Arq. Bras. Cir. Dig.**, v. 20, n. 1, p. 51-8, 2007.

CARDOSO-SILVA, C.; BARBERÍA, E.; MAROTO, M.; GARCÍA-GODOY, F. Clinical study of mineral trioxide aggregate in primary molars. Comparison between Grey and White MTA-a long term follow-up (84 months). **J. Dent.**, v. 39; n.2, p.187-193, 2011.

CARUSO, S. *et al.* Clinical and radiographic evaluation of biodentine versus calcium hydroxide in primary teeth pulpotomies: a retrospective study. **BMC Oral Health.**, v.18, n.54, p. 1-7, 2018.

CASSOL, D.V. *et al.* Iodoform vs calcium hydroxide/zinc oxide-based pastes: 12-month findings of a randomized controlled trial. **Braz. Oral Res.**, v.33, p. e0022019, 2019.

CLARK, R.A.F.: Wound repair: **Pathologic basis of disease**, 7^a ed., Ed. Saunders, p.112, 2005.

COSTA E SILVA, L.L *et al.* Comparison between calcium hydroxide mixtures and mineral trioxide aggregate in primary teeth pulpotomy: a randomized controlled trial. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 27, p. e20180030, 2019.

CHEN, C.A. *et al.* Effects of restorative materials on dental pulp stem cell properties. **J. Endod.**, v. 45, n.4, p. 420-426, 2019.

COELHO, M.C. *et al.* Effect of grape seed extract (GSE) on functional activity and mineralization of OD-21 and MDPC-23 cell lines. **Braz. oral res.**, v. 33, e013, 2019.

COLL, J.A.; SEALE, N.S.; VARGAS, K.; MARGHALANI, A.A.; AL SHAMALI, S.; GRAHAM, L. Primary tooth vital pulp therapy: a systematic review and meta-analysis. **Pediatr. Dent.**, v.39, n. 1, p.16-123, 2017.

COMES-SILVA, L. *et al.* Biocompatibility and immunohistochemical evaluation of a new calcium silicate-based cement, Bio-C Pulpo. **Int. Endod. J.**, v. 52, n. 5, p. 689-700, 2019.

COSTA, C.A.S. *et al.* Estudo preliminar da compatibilidade biológica dos cimentos de óxido de zinco e copaíba e óxido de zinco e eugenol. Avaliação histológica de implantes subcutâneos em ratos. **Rev. Odontol.**, v.25, n.1, v.19-26, 1996.

COSTA, E. M. M. B. *et al.* In vitro antimicrobial activity of plant extracts of semi-arid region of Paraíba, PB, Brazil. **Ver. Odonto Cienc.**, v. 28, n.4, 2013.

COSTA, V. P. P. *et al.* Primary and permanent dentitions: characteristics and differences. **Pedia. Rest. Dent.**, p. 23-29, 2018.

DAHER, A.; ALVES, K.; RODRIGUES, C.; REZENDE, L. Ineffectiveness of antibiotic-based pulpotomy for primary molars: a survival analysis. **Braz. Res. Pediat. Dent. and Integr. Clin.**, v.15, n.1, p.205-215, 2015.

DUNCAN, H.F. *et al.* European Society of Endodontology position statement: management of deep caries and the exposed pulp. **International Endodontic Journal.**, v. 52, p. 923–934, 2019.

EL MELIGY, O.A.E.S. *et al.* Biodentine™ versus formocresol pulpotomy technique in primary molars: a 12-month randomized controlled clinical trial. **BMC Oral Health.**, v.19, n.1, 2019.

ERDEM AP, *et al.* Success rates of mineral trioxide aggregate, ferric sulfate, and formocresol pulpotomies: a 24-month study. **Pediatr. Dent.**, v.33, n.2, p.165-70, 2011.

ESMERALDO, M.R.A. *et al.* Inflammatory effect of green propolis on dental pulp in rats. **Braz. Oral Res.**, v.27, n.5, p.417-22, 2013.

FREIRES, I.A.; CAVALCANTI, Y.W. Proteção do complexo dentinopulpar: indicações, técnicas e materiais para uma boa prática clínica. **Rev. Bras. Pesq. Saú.**, v.13, n.4, p.69-80, 2011.

GAWAD, R.Y.A.A.; HATEM, R.M. success rate of three capping materials used in pulpotomy of primary molars: a randomized clinical trial. **Research Square.**, v. 17, p. 2-28, 2020.

GANDOLFI, M.G.; SIBONI, F.; BOTERO, T.; BOSSÙ, M.; RICCITIELLO, F.; PRATI, C. Calcium silicate and calcium hydroxide materials for pulp capping: biointeractivity, porosity, solubility and bioactivity of current formulations. **J. Appl. Biomater. Funct. Mater.**, v. 13, n.1, p. 43-60, 2015.

GIRAUD, T. *et al.* Pulp capping material modulate the balance between inflammation and regeneration. **Dental Materials.**, v. 35, p. 24-35, 2019.

GHONIEM, N. *et al.* Mineral trioxide aggregate and diluted formocresol pulpotomy: prospective and retrospective study outcomes. **J. Mich. Dent. Assoc.**, v.100, n.4, p.40–65, 2018.

GOPALAKRISHNAN, V. *et al.* Qualitative assessment of published studies on pulpotomy medicaments for primary molar teeth. **J. Invest. Clin. Dent.**, v. 10, n. 2, p. e12389, 2019.

GUARNIERI, J. *et al.* Effect of Anadenanthera colubrina protease inhibitors a Paulinos an inflammatory mediator. **Natural Product Research.**, v. 30, n. 3, 2019.

GREWAL N, *et al.* Comparative evaluation of calcium silicate-based dentin substitute (biodentine®) and calcium hydroxide (pulpdent) in the formation of reactive dentin bridge in regenerative pulpotomy of vital primary teeth: triple blind, randomized clinical trial. **Contemp. Clin. Dent.** v.7, p.457–63, 2016.

HUGAR, S.M. *et al.* Comparative evaluation of clinical and radiographic success of formocresol, propolis, turmeric gel, and calcium hydroxide on pulpotomized primary molars: a preliminary study. **Inter. J. Clinic. Pediatr. Dent.**, v.10, n.1, p.18-23, 2017.

HUI, T. *et al.* Epigenetic regulation in dental pulp inflammation. **Oral Dis.**, v. 23, n. 1, p. 22-28, 2017.

ISO-7405 D-Peobomduid-Tmfdm. Preclinical Evaluation of Biocompatibility of Medical Devices Used in Dentistry: Test Methods for Dental Materials International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland 1–18. 1997.

ISO-7405 E-Peobomduid-Tmfdm. Preclinical Evaluation of Biocompatibility of Medical Devices Used in Dentistry: Test Methods for Dental Materials International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland 1–18. 2008.

ISO- 1093 Evaluation and testing within a risk management process; Test Methods for Dental Materials International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2018.

JAMALI, Z. *et al.* Randomized controlled trial of pulpotomy in primary molars using MTA and formocresol compared to 3mixtatin: a novel biomaterial. **J. Clinic. Pediatr. Dent.**, v. 42, n. 5, 2018.

JANG, J.H. *et al.* An overview of pathogen recognition receptors for innate immunity in dental pulp. **Mediators Inflamm.**, v. 2015, 2015.

JUNG, S.; SIELKER, S.; HANISCH, M.R.; LIBRICHT, V.; SCHÄFER, E.; DAMMASCHKE, T. Cytotoxic effects of four different root canal sealers on human osteoblasts. **PLoS One.**, v. 1, n. 3, p. e0194467, 2018.

JUNQUEIRA, M. A. *et al.* Clinical, radiographic and histological evaluation of primary teeth pulpotomy using MTA and ferric sulfate. **Braz. Dent. J.**, v. 29, n. 2, p. 159-165, 2018.

KALRA, M. *et al.* Comparative evaluation of fresh aloe barbadensis plant extract and mineral trioxide aggregate as pulpotomy agents in primary molars: a 12-month follow-up study. **Contemp. Clinic. Dent.**, v.8, n.1, p.106–111, 2017.

KUSUM, B.; RAKES, K.; RICHA, K. Clinical and radiographical evaluation of mineral trioxide aggregate, biodentine and propolis as pulpotomy medicaments in primary teeth. **Restor. Dent. Endod.**, v., 40, n. 4, p. 276-285, 2015.

LEE, J.H.; LEE, H.H.; KIM, H.W.; YU, J.W.; KIM, K.N.; KIM, K.M. Immunomodulatory/anti-inflammatory effect of ZOE-based dental materials. **Dent. Mater.**, v. 33, n. 1, p. e1-e12, 2017.

LI, Y. *et al.* Pulpotomy for carious pulp exposures in permanent teeth: a systematic review and metanalysis. **J. Dentist.**, v. 84, n. 2, p. 1-8, 2019.

LIKITPONGPIPAT, N. *et al.* Promotion of dental pulp wound healing in New Zealand white rabbits' teeth by thai propolis product. **J. Veter. Dent.**, 2018.

LIMA, R.V.E. *et al.* Pulp repair after pulpotomy using different pulp capping agents: A comparative histologic analysis. **Pediatr. Dent.**, v. 33, n. 1, p. 14-18, 2011.

LIMA, R.F. *et al.* Antimicrobial and antiproliferative potential of *Anadenanthera colubrina* (vell.) brenan. **Evidence-Based Complemen. Alter. Med.**, v.2014, ID 802696, p. 1-7, 2014.

LIMA, R.F. *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan: perfil químico e atividades anticandida, antibiofilme, antitumoral e citotóxica. 111p. 2018. **Tese (Doutorado)** – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2018.

LIN, P.Y. *et al.* Primary molar pulpotomy: A systematic review and network meta-analysis. **J. Dent.**, v.42, n.9, p.1060–1077, 2014.

LIU, H. *et al.* Mineral trioxide aggregate versus calcium hydroxide for pulpotomy in primary molars. **Chin. J. Dent. Res.**, v.4, n.2, p.121-5, 2011.

LIU, Q.; MA, Y.; WANG, J.; ZHU, X.; YANG, Y.; MEI, Y. Demineralized bone matrix used for direct pulp capping in rats. **PLoS ONE.**, v. 12, n. 3, p. e0172693, 2017.

LOPES, C.S. *et al.* Initial inflammatory response after the pulpotomy of rat molars with MTA or ferric sulfate. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 27, p. e201805501, 2019.

LOPES C.S. Avaliação da resposta pulpar inicial após o uso de MTA e sulfato férrico em pulpotomias de molares de ratos. 75p. 2018. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Federal da Alfenas, Centro de Ciências da Saúde, 2018.

LOPES, H. P.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. F. **Endodontia: biologia e técnica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

LOURENÇO NETO, N. *et al.* Terapia pulpar em dentes decíduos: possibilidades terapêuticas baseadas em evidências. **Rev. Odontol. UNESP.**, v.42, n.2, p.130-137, 2013.

LUENGO-FEREIRA, J. *et al.* Clinical and radiographic evaluation of formocresol and chloramphenicol, tetracycline and zinc oxide-eugenol antibiotic paste in primary teeth pulpotomies: 24 month follow up. **J. Clin. Pediatr. Dent.**, v.43, n.1, 2019.

LUO, H *et al.* Inhibition of SOX9 promotes inflammatory and immune responses of dental pulp. **Journal of Endodontic.**, v 1, n 8, 2018.

MACEDO-COSTA, M.R.; SANTOS, C.A.O. **Fitoterapia: Uma opção para tratamento endodôntico**. 1 ed. João Pessoa: Novas edições acadêmicas. 2019.

MARCONYAK, L.J.; KIRKPATRICK, T.C., ROBERTS, H.W., ROBERTS, M.D.; APARICIO, A.; HIMEL V.T. *et al.* A comparison of coronal tooth discoloration elicited by various endodontic reparative materials. **J. Endod.**, v. 42, n. 3, p. 470-473, 2016.

MARIZ, P.; CAVALCANTI, R.; ALVEZ, S. Clinical and radiographic monitoring of primary teeth submitted to pulp therapy with CTZ paste. **Braz. Res. Ped. Dent. Int. Clin.**, v.14, p.56-68, 2014.

MASS, E.; ZILBERMAN, U. Long-term radiologic pulp evaluation after partial pulpotomy in Young permanent molars. **Quintessence Int.**, v.42, n.7, p.547-554, 2011.

MENDONÇA, R.J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **An. Bras. Dermatol.**, v. 84, n.3, p.257-62, 2009.

MESLMANI, W. *et al.* The efficacy of Portland cement as a pulpotomy agent in deciduous teeth. **Pediatric Dental Journ.**, v. 30, n. 1, p. 1-7, 2020.

MOHAMMAD, S.G, RAHEEL, S.A, BAROUDI K. Histological evaluation of Allium sativum oil as a new medicament for pulp treatment of permanent teeth. **J. Contemp. Dent. Pract.**, v.16, n. 2, p.85-90, 2015.

MOTA, G. S. Características anatômicas e ecológicas de casca e madeira de *Anadenanthera*. 2016. **Tese (doutorado)** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2016.

MOTA, G.S. *et al.* Bark anatomy, chemical composition and ethanol-water extract composition of *Anadenanthera peregrina* and *Anadenanthera colubrina*. **PLoS ONE.**, v.12, n.12, p. e0189263, 2017.

MOURA, L.F.A.D. *et al.* Cellular profile of primary molars with pulp necrosis after treatment with antibiotic paste. **Int. J. Exp. Path.**, v.99, p.264-268, 2018.

- MUSALE, P.K. *et al.* Mineral trioxide aggregate pulpotomy: patient selection and perspectives. **Clinic. Cosmet. Investigat. Dent.**, v.10, p. 37-43, 2018.
- NAKORNCHAI, S.; BANDITSING, P.; VISETRATANA, N. Clinical evaluation of 3 Mix and vitapex as treatment options for pulpally involved primary molars. **Int. J. Paediatr. Dent.**, v.20, p.214-221, 2010.
- NUNES, L.E. Estudo de interações “in vitro” entre extratos hidroalcoólicos de plantas medicinais e drogas antimicrobianas sobre linhagens multiresistentes de *Staphylococcus* sp. 73p. 2011 [**Trabalho de Conclusão de Curso**] – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas da Saúde, 2011.
- OLIADARANI, F.K. *et al.* Histopathological evaluation of dental pulp of primary teeth pulpotomized with formocresol with/without a capping agent: a randomized clinical Trial. **J. Inter. Soc. Preven. Communit. Dent.**, v. 8, n.5, 2018.
- OLIVEIRA, M. A. C.; COSTA, L. R. R. S. Desempenho clínico de pulpotomias com pasta CTZ em molares decíduos: estudo retrospectivo. **Robrac**, v.15, n.40, 2006.
- PAULA, A.B. *et al.* Evaluation of dentinogenesis inducer biomaterials: an in vivo study. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 28, p.e20190023, 2020.
- PESSOA, W.S. *et al.* Fibrogenesis and epithelial coating of skin wounds in rats treated with angico extract (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*). **Acta Cirúrg. Bras.**, v.30, n. 5, 2015.
- PRABHAKAR, A.R. *et al.* Pulpotomy with curcumin: histological comparison with mineral trioxide aggregate in rats. **Ind. J. Dent Res.** v.30, n. 1, p. 31-36, 2019.
- PRATIMA, B. *et al.* Postoperative assessment of diode laser zinc oxide eugenol and mineral trioxide aggregate pulpotomy procedures in children: A comparative clinical study. **J. Indian Soc. Pedod. Pre. Dent.**, v.36, n.3, p.308-314, 2018.
- PORDEUS, I.A.; PAIVA, S.M. **Odontopediatria**. Série Abeno. São Paulo: Artes Médicas, 2014.
- RAO, Q. *et al.* Comparison of iRoot BP Plus and calcium hydroxide as pulpotomy materials in permanent incisors with complicated crown fractures: a retrospective study. **J. Endod.**, v. 46, n. 3, p. 352-357, 2020.
- RICKETTS, D.; LAMONT, T.; INNES, N.P.; KIDD, E.; CLARKSON, J.E. Operative caries management in adults and children. **Cochrane Database Syst.**, v. 3, p. 03808, 2013.
- ROCHA, E.A.L.S. Atividade antifúngica, caracterização fitoquímica e perfil térmico da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. 81p. 2014 **Dissertação (Mestrado)** - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2017.
- _____. *et al.* Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. **Rev. Ciênc. Farm. Básica.**, v. 34, n. 3, p.

351-355, 2013.

_____. *et al.* Antifungal Activity, Phytochemical Characterization and Thermal Profile of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada.**, v. 17, n. 1, p. e3389, 2017.

ROYER, D. *et al.* Pulpotomia na rede pública em municípios da região norte do Rio Grande do Sul. **J. Oral. Invest.**, v. 7, n. 2, p. 46-57, 2018.

SADAF, D. Success of coronal pulpotomy in permanent teeth with irreversible pulpitis: an evidence-based review. **Cureus.**, v. 12, n. 1. p e6747, 2020.

SAIKIRAN, K.V. *et al.* Pulpotomy medicaments in primary teeth: A literature review of natural alternatives. **SRM J. Res. Dent. Scien.**, v.9, n.4, 2018.

SANTOS, J.S, MARINHO, R.R, KUNDI-VALENTIMETAL, E.E. Beneficial effects of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan extract on the inflammatory and nociceptive responses into dent models. **J Ethnopharma.**, v.148, n.1, p.218–222, 2013.

SARAIVA, J.A; DA FONSECA, T.S; DA SILVA, G.F. *et al.* Reduced interleukin-6 immunoexpression and birefringent collagen formation indicate that MTA Plus and MTA Fillapex are biocompatible. **Biomed. Mater.** v.13, n.3, p. 035002, 2018.

SESEOGULLARI-DIRIHAN, R. *et al.* Use of crosslinkers to inactivate dentin MMPs. **Dent. Mater.**, v. 32, n. 3, p. 423-32, 2016.

SILVA, A.C.O. *et al.* Interleukin-1 beta and interleukin-8 in healthy and inflamed dental pulps. **Journal of Applied Oral Science**, v.17, n.5, p.527-532, 2009.

SILVA, D.R.; ROSALEN, P. L.; FREIRES, I.A. *et al.* *Anadenanthera Colubrina* vell Brenan: anti-*Candida* and antibiofilm activities, toxicity and therapeutical action. **Braz. Oral Res.** v. 33, p. e023, 2019.

SILVA, G. F. *et al.* Microparticulated and nanoparticulated zirconium oxide added to calcium silicate cement: evaluation of physicochemical and biological properties. **J. Biomed. Mater. Res. A.**, v. 102, n. 12, p. 4336-4345, 2015.

SMAÏL-FAUGERON, V. *et al.* Pulp treatment for extensive decay in primary teeth. **Coch. Dat. Syst. Rev.**, n.5. Art. No.: CD003220, 2018.

SOUSA, P. M.; DUARTE, R. C.; SOUSA, S. A. Acompanhamento clínico e radiográfico de dentes decíduos submetidos à terapia pulpar com a pasta CTZ. **Braz. Res. Pediat. Dent. Integr. Clin.**, v.14, n. 13, p.56-68. 2014.

SOUZA, V.G de. Tecnologias de controle e produção da matéria prima vegetal, obtidas a partir das folhas de angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var *Cerbil* (Griseb.)

Altschul) 140p. 2018. **Tese (doutorado)** - Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, 2018

STRINGHINI-JUNIOR, E.; VITCEL, M.E.B.; OLIVEIRA, L.B. Evidence of pulpotomy in primary teeth comparing MTA, calcium hydroxide, ferric sulphate, and electrosurgery with formocresol. **Eur. Arch. Paediatr. Dent.**, v. 16, 303–312, 2015.

SUNITHA, B. *et al.* Clinical and radiographic evaluation of four different pulpotomy agents in primary molars: a longitudinal study. **Int. J. Clin. Pediatr. Dent.**, v.10, n.3, p.240–244, 2017.

SUZUKI, S. *et al.* Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. **Matrix Biology.**, v. 28, n. 4, p. 221-229, 2009.

TAYLOR, G.D.; VERNAZZA, C.R.; ABDULMOHSEN, B. Success of endodontic management of compromised first permanent molars in children: a systematic review. **Int. J. Paediatr. Dent.**, v. 30, n. 3, p. 370-380, 2019.

TAKUSHIGE, T.; HOSHINO, E. Endodontic retreatment using 3Mix- MP without removal of previous root canal obturation. **J. LSTR.**, v.8, p.3-7, 2009.

TRAIRATVORAKUL, C.; DETSOMBOONRAT, P. Success rates of a mixture of ciprofloxacin, metronidazole, and minocycline antibiotics used in the non-instrumentation endodontic treatment of mandibular primary molars with carious pulpal involvement. **Int. J. Paediatr. Dent.**, v.22, n.3, p.217-227, 2012.

TRONGKIJ, P. *et al.* Effects of the exposure site on histological pulpal responses after direct capping with 2 calcium-silicate based cements in a rat model. **Restor. Dent. Endod.**, v.43, n.4, e362018, 2018.

YANG, Y.T. *et al.* The Effect of partial pulpotomy with iroot bp plus in traumatised. **Dent. Traumat.**, v. 25, p. e12553, 2020.

YILDIZ, E.; TOSUN, G. Evaluation of formocresol, calcium hydroxide, ferric sulfate, and MTA primary molar pulpotomies. **Europ. J. Dent.**, v.8, n.2, p.234–40, 2014.

ZANINI, M *et al.* Pulp inflammation diagnosis from clinical to inflammatory mediators. **Journal of Endodontic.**, v. 43, p. 1033-1051, 2017.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA).



PARECER
NÚMERO DO PROJETO/ PROTOCOLO: 008308112019
CIAEP/CONCEA N°: 01.001.2012
DATA DO PARECER: 08/11/2019

1. Pesquisador Responsável: Edja Maria Melo de Brito Costa

Título do Projeto: AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA POLPA DENTÁRIA DE RATO APÓS PULPOTOMIA E SELAMENTO PULPAR COM UMA FORMULAÇÃO À BASE DE ANADENANTHERA COLUBRINA (VELL.) BRENAN

2. Considerações: Este projeto envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, estando **APROVADO** pela da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CESED, tendo sido recebido em 08/11/2019.

Vigência do Projeto	01 de Outubro de 2019 a 01 de Dezembro 2019
Espécie / linhagem	Rattus norvegicus / Wistar/ Albina
Nº de animais	31
Peso / idade	250-300 g / adultos
Sexo	Machos
Origem	BIOTÉRIO CESED

3. Parecer Final: **APROVADO**

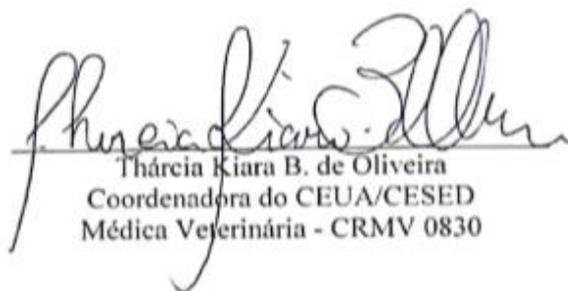

 Tharcia Klara B. de Oliveira
 Coordenadora do CEUA-CESED



Ata 48ª Reunião da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/CESED

Ao oitavo dia do mês onze, do ano de dois mil e dezenove, às 16h00min horas, realizou-se na sede do Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento - reunião da **CEUA/CESED**. A pauta da reunião foi apresentada e decorreu-se a análise do seguinte projeto: **AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA POLPA DENTÁRIA DE RATO APÓS PULPOTOMIA E SELAMENTO PULPAR COM UMA FORMULAÇÃO À BASE DE ANADENANTHERA COLUBRINA (VELL.) BRENAN** da pesquisadora **Edja Maria Melo de Brito Costa - (APROVADO)**; Após a avaliação ética do projeto em pauta, às 17h00min se deu como encerrada a reunião.

Campina Grande, 08 de Novembro de 2019.



Thárcia Kiara B. de Oliveira
Coordenadora do CEUA/CESED
Médica Veterinária - CRMV 0830

AYANNE ALVES DE OLIVEIRA
ALYNE DA SILVA PORTELA
EDROALDO V. CAVALCANTE DE ARAÚJO
FELIPPE BARBOSA GOMES
MARIA CECÍLIA SANTOS CAVALCANTI MELO
MARIA JOSÉ MOREIRA
THÁRCIA KIARA B. DE OLIVEIRA
THIAGO DE OLIVEIRA ASSIS