



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



ROGÉRIO RODRIGUES CUPERTINO

**EFEITO DA INTERFERÊNCIA COM A
NEUROTRANSMISSÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA
PROTEÇÃO PULPAR INDIRECTA**

MARINGÁ
2010

ROGÉRIO RODRIGUES CUPERTINO

Efeito da interferência com a neurotransmissão do óxido nítrico na proteção pulpar indireta

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rúbia Maria Monteiro Weffort de Oliveira

MARINGÁ

2010

ROGÉRIO RODRIGUES CUPERTINO

Efeito da interferência com a neurotransmissão do óxido nítrico na proteção pulpar indireta

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, da Universidade Estadual de Maringá.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Vanessa Cristina Veltrini

Departamento de Odontologia – Centro Universitário de Maringá - CESUMAR

Prof^o. Dr^o. Carlos Alberto Herrero de Moraes

Departamento de Odontologia – Universidade Estadual de Maringá - UEM

Prof^a. Dr^a. Rúbia Maria Monteiro Weffort de Oliveira

Orientadora

Departamento de Farmácia e Farmacologia – UEM

AGRADECIMENTOS

A Deus que permitiu a minha existência e tem me dado paz, saúde e sabedoria.

Aos meus amados pais Creuza Rodrigues Cupertino e José Ozório de Almeida Cupertino que sempre me incentivaram e apoiaram em todas as minhas decisões. Sendo um exemplo de vida e de dignidade. Agradeço todos os dias por vocês existirem.

As minhas irmãs Viviane e Simone que sempre estiveram ao meu lado me ajudando e apoiando.

A minha namorada, Gesiele de Oliveira, que divide seu tempo com meus estudos e trabalho, sempre me incentivando e apoiando.

A minha orientadora, professora Rúbia Maria Monteiro Weffort de Oliveira, gostaria de agradecer a pessoa grandiosa, generosa e corajosa que você é. Despertando sua vocação em muitos e possibilitando a realização de um dos meus sonhos.

Aos técnicos Solidalva, Carlão, Marcos, Maria dos Anjos, Eurides, Cleonira e a secretária Helena pela compreensão, paciência e apoio.

Aos Amigos do laboratório, que me ajudaram e foram importantíssimos, compartilhando seus conhecimentos nas atividades diárias e presentes no convívio.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:15

FIGURA 2:25

FIGURA 3:26

FIGURA 4:27

QUADRO 1:18

LISTA DE QUADRO E TABELAS

TABELA 1:.....	19
TABELA 2:	20

LISTA DE ABREVIATURAS

- CaOH₂** – Hidróxido de Cálcio
- CIV** – Cimento de ionômero de vidro
- EDTA** - Ácido etilenodiamino tetra-acético
- eNOS** – Óxido nítrico sintase endotelial
- FDA** – Food and drug administration
- GCs** – Guanilato ciclase solúvel
- GMPc** – Guanidina monofosfato cíclico
- HE** - Hematoxilina-eosina
- iNOS** – Óxido nítrico sintase induzível
- L-NAME** – N(g)-nitroarginina metil éster
- nNOS** – Óxido nítrico sintase neuronal
- NO** – Óxido nítrico
- NOS** – Óxido nítrico sintase
- PDE-5** – Fosfodiesterase - 5
- PFA** – Paraformaldeído
- PMN** - Polimorfonucleares

RESUMO

A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no controle do fluxo sanguíneo e da inflamação pulpar bem como o desenvolvimento de materiais a serem empregados nos procedimentos conservadores em endodontia, são relevantes para a clínica odontológica. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a resposta da polpa dental à proteção pulpar indireta com substâncias que interferem com a neurotransmissão do NO, como o L-NAME e o Sildenafil, incorporados em sistema polimérico bioadesivo e termo-sensível (gel). Ratos Wistar machos foram submetidos ao preparo cavitário de classe I na mesial no sulco central dos molares superiores e inferiores (experimento I) e proteção pulpar indireta (experimento II), e o estado pulpar foi avaliado quanto a presença de infiltrado inflamatório. A resposta inflamatória mais intensa foi observada três dias após o preparo cavitário. Aparentemente, o uso apenas do gel intensificou a resposta inflamatória. Efeito dual foi observado com o gel acrescido de Sildenafil. Enquanto que em baixa concentração (0,015%, p/p) o Sildenafil promoveu um efeito positivo sobre o estado pulpar, em concentração maior (0,15%, p/p) o mesmo composto induziu resposta inflamatória severa e necrose pulpar. Este é um estudo pioneiro que usa um sistema polimérico bioadesivo e termo-sensível contendo substâncias que interferem com a neurotransmissão do NO na proteção pulpar indireta. Os resultados obtidos mostram que a concentração de NO local pode ser determinante na resposta pulpar, desde que Sildenafil 0,015% (p/p) promove diminuição do processo inflamatório e melhora do estado pulpar, enquanto que Sildenafil 0,15% (p/p) resulta em intensa inflamação e necrose. Estudos futuros para a verificação dos efeitos desse gel na polpa dental, bem como dos prováveis mecanismos moleculares relacionados aos efeitos do Sildenafil na proteção pulpar indireta deverão ser realizados.

Palavras-chave: Óxido nítrico, Sildenafil, L-NAME, sistema polimérico bioadesivo (gel), proteção pulpar indireta, ratos.

ABSTRACT

Comprehension of molecular mechanisms involved in the control of blood flow and dental pulp inflammation as well as the introduction of new materials to be used in the dental pulp conservative procedures are important for the dentistry clinic. The aim of the present work was to evaluate the dental pulp state after indirect pulp capping using substances that interfere with nitric oxide (NO) neurotransmission such as L-NAME and Sildenafil, incorporated to a polymeric bioadhesive system (gel). Male Wistar rats were submitted to maxillary and jaw first molars class I cavity preparation (experiment I) followed by indirect pulp capping (experiment II), and the pulp state was evaluated considering the inflammatory infiltrate. The most intense inflammatory response was observed three days after cavity preparation. Seemingly, the use of the gel of polymeric intensified the inflammatory response. Dual effect was observed with gel plus Sildenafil. While in low concentration Sildenafil (0.015% w/w) promoted a positive effect on the pulp state, in larger concentration (Sildenafil 0.15% w/w) it caused severe inflammatory response and pulp necrosis. This is a pioneer study using a polymeric bioadhesive and thermosensitive system (gel) containing substances that interfering with NO neurotransmission in the indirect pulp protection. The present results show that the NO concentration may be determinant in the pulp response, since Sildenafil 0.015% promotes decrease of the inflammatory process and improve the pulp state, while Sildenafil 0.15% induces inflammation and necrosis. Future studies on verification of the effects of the polymeric gel in the dental pulp response, as well as of the probable molecular mechanisms related to the effects of Sildenafil in the protection indirect pulp should be conducted.

Keywords: nitric oxide (NO), Sildenafil, L-NAME, polymeric bioadhesive system (gel) indirect pulp capping, rats.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	11
2. Materiais e Métodos.....	13
2.1 Animais.....	13
2.2 Fármacos.....	14
2.3 Procedimento Experimental.....	14
2.3.1 Experimento I.....	15
2.3.2 Experimento II.....	15
2.4 Análise Histológica.....	16
3. Resultados.....	18
3. Discussão.....	21
4. Conclusão.....	28
5. Referências Bibliográficas.....	28

1. INTRODUÇÃO

A realização do tratamento conservador da polpa dental é uma das principais atividades do clínico geral. Isto porque, amiúde, defronta-se com pacientes cuja queixa principal se traduz por sintoma doloroso localizado em algum dente, quase sempre com lesão cariosa, expondo ou não a polpa dental (HARGREAVES; GOODS, 2002). Os tratamentos conservadores compreendem a proteção pulpar indireta, a proteção pulpar direta e a pulpotomia, que têm por objetivo diminuir a agressão imposta por agentes de origem química, bacteriana, mecânica ou térmica, bem como preservar a vitalidade e a função pulpar (RUTHERFORD; FITZGERALD, 1995; TZIAFAS et al., 2005). Basicamente, duas estratégias têm sido utilizadas no tratamento conservador da polpa: i) o preparo cavitário para remoção da agressão e posterior isolamento do complexo dentina-polpa e, ii) o capeamento com materiais que estimulem processos biológicos que levem a dentinogênese (TZIAFAS et al., 2005).

A reação inflamatória pulpar após agressão ou preparo cavitário é caracterizada por alterações do fluxo sanguíneo, das células do sistema imune e da reatividade neural (LAW et al., 1999). Evidências experimentais indicam que o óxido nítrico (NO) participa de todas estas alterações, atuando como mediador da homeostase vascular (BERGREEN; HEYERAAS, 1999; KISPELYI et al., 2005), modulador da atividade pró-inflamatória (FAN et al., 2009) e sinalizador para diferenciação celular e subsequente formação da dentina reparadora (YASUHARA et al., 2007).

A presença do NO tem sido detectada em polpas dentais no estado normal ou inflamado de várias espécies, incluindo roedores e humanos (KEREZOUZDIS et al., 1993; LOHINAI et al., 1997; MEI et al., 2007). Recentemente, MEI et al. (2007) demonstraram acentuada liberação de NO de odontoblastos e células pulpares em estágios recentes após preparo cavitário, mostrando que este mediador participa da diferenciação de odontoblastos durante a dentinogênese. O NO é sintetizado por enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS), que se apresentam em três isoformas: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS) (BREDET et al., 1990). A eNOS e nNOS são constitutivas e dependentes de cálcio para serem ativadas

(CARMIGNANI et al., 2000), enquanto que a iNOS é produzida por macrófagos estimulados por citocinas (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003). O principal alvo do NO é a guanilato ciclase solúvel (GCs; ARNOLD et al., 1977), que quando ativada, resulta na síntese do segundo mensageiro GMPc (PALMER et al., 1987), que por sua vez induz relaxamento do músculo liso, o que leva a vasodilatação (MONCADA et al., 1991). Experimentalmente, é possível interferir com o sistema NO/NOS através do uso de substâncias que podem doar NO, servir de substrato ou inibir as NOS, como o N-nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME), ou ainda interferir com o metabolismo do GMPc, como o Sildenafil. O último é uma droga vasoativa que tem a capacidade de aumentar os níveis da GMPc, e conseqüentemente os efeitos da neurotransmissão nitrérgica, por ser inibidor da fosfodiesterase-5 (PDE-5), enzima que metaboliza o GMPc. O Sildenafil foi inicialmente sintetizado para tratar a hipertensão arterial e a angina pectoris, sendo aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA, 1998) para o tratamento da disfunção erétil e tratamento da hipertensão pulmonar (RAMANI; PARK, 2010).

Considerando o papel do NO na regulação da homeostasia vascular do dente, a administração sistêmica (LOHINAI et al., 1995) de N-nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME) diminui significativamente o fluxo sangüíneo com concomitante aumento da resistência vascular. Em modelo experimental de proteção pulpar indireta, a administração local de L-NAME reduziu o diâmetro da arteríola pulpar, tanto em condições basais, quanto na presença de inflamação (KISPÉLYI et al., 2005), sugerindo importante papel para o NO na vasodilatação aguda induzida pela aplicação de materiais capeadores e na manutenção do tônus da arteríola pulpar.

Embora os processos biológicos relacionados à preservação da polpa dental tenham sido sistematicamente investigados, existem ainda controvérsias quanto aos mecanismos pelos quais os materiais utilizados no capeamento pulpar induzem o reparo tecidual (TZIAFAS, 2005). Há décadas, o tratamento de escolha para a realização do capeamento pulpar tem sido o hidróxido de cálcio (CaOH₂; FARHAD; MOHAMMADI; IRAN, 2005). Por apresentar pH fortemente alcalino, o CaOH₂ provoca o desenvolvimento de um processo inflamatório local, que resulta no recrutamento de células que proliferam e se

diferenciam em odontoblastos, os quais contribuirão para a formação de uma matriz extracelular mineralizada rica em dentina reparadora (GOLDBERG et al., 2008). No entanto, o capeamento pulpar com CaOH_2 apresenta limitações, como a fraca adesão a dentina, a baixa capacidade para selar o sítio exposto e, pouca durabilidade (para revisão ver KIBA et al., 2010). Além disto, a dentina reparadora induzida pelo CaOH_2 não é homogênea, podendo mostrar-se permeável e susceptível a colonização bacteriana (GOLDBERG et al., 2008). Estes aspectos clínicos têm levado a busca por novos materiais e estratégias terapêuticas que promovam o reparo tecidual (DAMMASCHKE et al., 2010).

Recentemente, um sistema polimérico binário para liberação de fármacos, contendo poloxamer 407 (P407) e Carbopol® 934P (C934P), foi desenvolvido e suas características físicas e físico-químicas estudadas. Esse sistema apresentou importantes características de bioadesão e de termo-sensibilidade, tornando-se mais viscoso com o aumento da temperatura, sendo utilizado para a liberação de fármaco no interior da bolsa periodontal (BRUSCHI et al., 2007).

A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no controle do fluxo sanguíneo e inflamação pulpar bem como a introdução de materiais a serem empregados nos procedimentos conservadores da polpa dental, são relevantes para a clínica odontológica. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a resposta da polpa dental após proteção pulpar indireta com substâncias que interferem com a neurotransmissão do NO como o L-NAME e o Sildenafil, incorporados em um sistema polimérico binário bioadesivo e termo-sensível.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) albinos da linhagem Wistar, machos (300-340 g), provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Por um período prévio de 72h e durante os testes, todos os animais foram mantidos em gaiolas plásticas em ambiente com ciclo de luz

claro/escuro (12h) e temperatura controlada ($22^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$). Os animais receberam comida e água ad libitum. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação em Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEEAA, parecer nº. 034/2007).

2.2 Fármacos

1. Sildenafil 0,015% p.p e 0,15% p.p (Citrato de Sildenafil, China, 2007).
2. N^{G} -nitro-L-arginine methyl ester 10^{-4} mol/L (L-NAME; Sigma, USA).
3. Hidróxido de cálcio P.A. (CaOH_2 ; Biodinâmica, Brasil).

Uma solução saturada em pasta de CaOH_2 e soro fisiológico estéril foi manipulada para inserção direta da mesma na cavidade do preparo, conforme uso rotineiro. Sildenafil e L-NAME foram incorporados em um sistema polimérico binário formado por P407 e C934P. C934P foi disperso em água destilada, sob agitação mecânica. Em seguida, foi incorporado o P407 e deixado na geladeira em repouso por 12h. Após esse período, o gel foi submetido a agitação mecânica por 10 min e ajustou-se o pH para 7,0 com trietanolamina. Após 12 horas, houve a incorporação de Sildenafil (0,015% ou 0,15%, p/p) ou de L-NAME (10^{-4} mol/L). A concentração do L-NAME utilizada foi baseada no trabalho de Kispélyi et al. (2005).

2.3 Procedimento Experimental

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal contendo a mistura de 1 mL/kg de cloridrato de xilazina (Rompun®, Bayer S.A, São Paulo, Brasil) e cloridrato de ketamina (Dopalen®, Sespo Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, Brasil). Após a certificação da anestesia, o animal era colocado em um aparato de madeira, em decúbito dorsal com a boca mantida aberta, com o auxílio de presilhas metálicas, para realização do preparo cavitário (Figura 1). Para o capeamento pulpar indireto, foi preparada uma cavidade do tipo I na face mesial da superfície oclusal dos primeiros-molares superiores e inferiores, sem exposição pulpar, com o uso de um

contra-ângulo de alta rotação trabalhando em aproximadamente 120.000 rpm (DECUP et al., 2000). Para este procedimento, foram utilizadas brocas esféricas diamantadas de haste longa de número 1011. As cavidades preparadas foram secas com bolinhas de algodão estéreis e preenchidas com o CaOH_2 , ou, com uma gota do gel ou gel incorporado com os fármacos, obtida de uma seringa de 3 mL. Após a geleificação do material, que ocorreu em cerca de 30-40s, as cavidades foram restauradas temporariamente com cimento de ionômero de vidro (CIV; Vidrion R[®], SS White, Brasil).

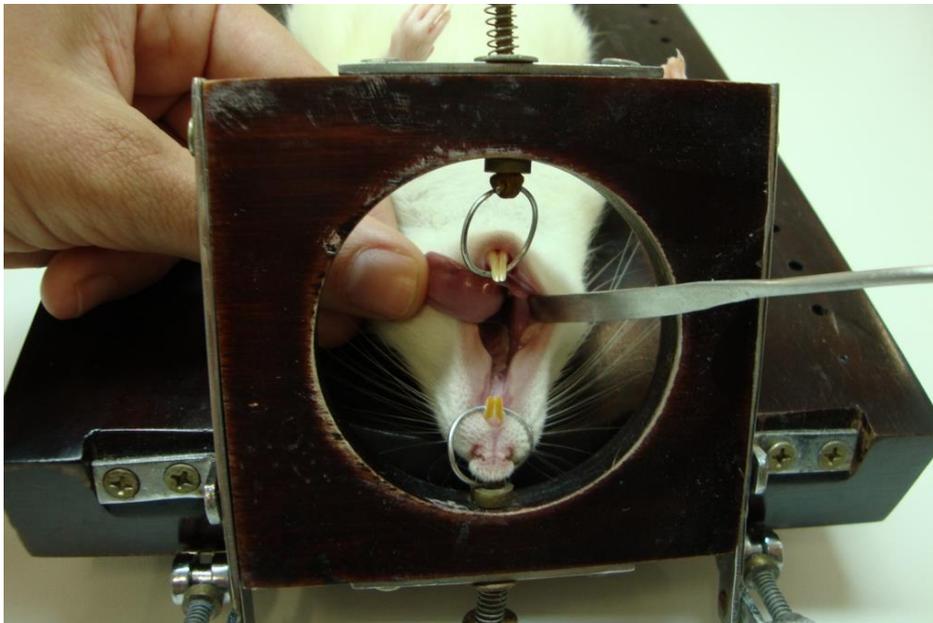


Figura 1. Fotografia do animal anestesiado colocado no aparato de madeira em decúbito dorsal, com a boca aberta para a realização do preparo cavitário.

2.3.1. Experimento I – Decurso Temporal das Alterações da Polpa Dental

Treze animais foram selecionados e aleatoriamente divididos em três grupos experimentais, de acordo com o tempo de morte após preparo cavitário, sendo respectivamente, um, três e sete dias.

2.3.2 Experimento II – Proteção Pulpar Indireta

Para a avaliação da proteção pulpar indireta, cinco animais receberam o preparo cavitário, conforme descrito acima. Após secagem, o mesmo era preenchido com os diferentes tratamentos:

- CaOH₂
- Gel de polímero
- Gel de polímero + sildenafil 0.015% (p/p)
- Gel de polímero + sildenafil 0.15% (p/p)
- L-NAME 10⁻⁴ mol/L

Os tratamentos foram realizados em forma de rodízio nos primeiros-molares superiores e inferiores, direitos e esquerdos, sucessivamente, permitindo que todas as combinações com os diferentes fármacos fossem efetuadas em todos os primeiros-molares. Neste experimento, os animais foram mortos 3 dias após o capeamento pulpar indireto.

2.4 Análise Histológica

Os animais foram anestesiados com overdose de Tiopental (Thiopentax®, Cristália, SP, Brasil) e perfundidos transcárdicamente com 100 mL de solução salina 0,9%, seguida de 100 mL de solução fixadora de paraformaldeído tamponado a 4% (PFA 4%), com o auxílio de uma bomba peristáltica (Milan®, BP-601, Brasil). Em seguida, os animais foram decapitados e dissecados para remoção em bloco dos componentes epiteliais e musculares circundantes à maxila e mandíbula. As maxilas e mandíbulas foram mantidas em PFA 4%, overnight. Os espécimes foram então desmineralizados, através da utilização de uma solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA 10%) em tampão fosfato (pH=7,0), por aproximadamente 14 dias (LAW et al., 1999). O ponto de desmineralização foi verificado diariamente utilizando-se uma agulha hipodérmica, sendo que esta era pressionada contra a estrutura dentária, até que a mesma penetrasse no dente com uma leve resistência. Após a obtenção do ponto de

desmineralização, as peças foram lavadas em água corrente por um período de 4h para remoção do agente desmineralizador. A estrutura dental foi então submetida à desidratação em uma série gradual de etanol, diafanizadas em xilol e emblocadas em parafina (56°C). As peças descansaram por um período de 24h, sendo então desbastadas para retirada do excesso de parafina e posteriormente hidratadas por três dias. Cortes longitudinais semi-seriados foram obtidos com o auxílio de um micrótomo (LEICA RM224, Alemanha). Foram confeccionadas lâminas em quintuplicatas contendo 5 secções com espessura de 7µm cada. Secções adjacentes foram processadas para hematoxilina-eosina (HE), coloração de Azan e Picrosirius hematoxilina.

Os cortes provenientes do processamento histotécnico foram qualitativamente analisados, para diagnóstico do estado pulpar quanto aos sinais ou critérios morfológicos que denotassem presença de infiltrado inflamatório agudo e/ou crônico de acordo com os parâmetros descritos no Quadro 1, os quais foram baseados no trabalho de Six et al. (2002). As colorações de Picrosirius hematoxilina e Azan, tiveram por objetivo dar contraste aos componentes do tecido conjuntivo que apresentassem fibras colágenas existentes e fibras colágenas novas, respectivamente (VIER-PELISSER et al., 2007). Na coloração Picrosirius hematoxilina, as moléculas deste corante ligam-se as fibras colágenas, num arranjo paralelo, corando as fibras colágenas de vermelho (JUNQUEIRA et al. 1979). Na coloração de Azan, as fibras colágenas apresentam-se coradas de azul, com núcleo azulado e citoplasma amarelo ou cinza (Gray, 1954).

Para as colorações HE e Azan, as secções foram analisadas em microscópio de luz binocular (Olympus CBA-213, MicroNal, São Paulo, Brasil). Para a coloração Picrosirius hematoxilina, as secções foram analisadas em microscópio de luz polarizada (Olympus BX 50, Japão), dada a refração dupla resultante do arranjo entre o corante e as fibras colágenas.

Quadro 1. Critérios morfológicos do infiltrado inflamatório utilizados para avaliar o estado pulpar. Baseado de Six et. al., (2002).

Camada de Odontoblastos	Organizada Desorganizada
Tipo de infiltrado inflamatório	Polimorfonucleares (PMN) Mononucleares (MN)
Intensidade do infiltrado inflamatório	Leve Moderado Severo
Vasos sanguíneos	Ingurgitado Não-ingurgitado
Necrose	Presente Ausente

3. RESULTADOS

No experimento I os dentes dos ratos foram restaurados temporariamente com CIV após preparo cavitário e o estado da polpa dental foi avaliado em diferentes tempos após a restauração. Nos grupos 1 e 7 dias após o preparo cavitário, observou-se a manutenção da integridade da camada de odontoblastos, a qual se apresentou de forma organizada, presença de vasos sanguíneos ingurgitados, e infiltrado inflamatório leve com predominância de células PMN (Tabela 1; Figura 2). Para os animais mortos 3 dias após o preparo cavitário, o infiltrado inflamatório foi moderado. Caracteristicamente, o infiltrado inflamatório apresentou-se mais intenso quanto mais próximo do preparo cavitário e a camada de odontoblastos, desorganizada, conforme apresentado na Figura 2. Não se observou a presença de abscesso ou necrose em nenhum dos grupos experimentais, ou seja, 1, 3 ou 7 dias após o preparo.

Tabela 1. Preparo cavitário seguido de restauração com CIV. Os animais foram sacrificados 1, 3, e 7 dias após o preparo cavitário.

	1 dia	3 dias	7 dias
Camada de Odontoblastos	Organizada	Organizada/Desorganizada	Organizada
Vasos Sanguíneos Presença Ingurgitamento	Presente Ingurgitados	Presente Ingurgitados	Presente Ingurgitados
Infiltrado Inflamatório Tipo Intensidade	PMN Leve	PMN Moderado	PMN Leve
Necrose	Ausente	Ausente	Ausente

No experimento II os dentes dos animais foram preenchidos com CaOH₂, gel de polímero e gel de polímero acrescido de Sildenafil ou L-NAME, e, em seguida restaurados com CIV. Todos os animais foram sacrificados três dias após o capeamento pulpar indireto. O CaOH₂ é a droga considerada controle positivo pelo amplo e rotineiro uso na endodontia (SIQUEIRA; LOPES, 1999). No tratamento com CaOH₂ houve a manutenção da camada de odontoblastos, com infiltrado inflamatório leve, presença de células PMN e vasos sanguíneos ingurgitados (Tabela 2, Figura 3). Resultados semelhantes foram observados nos dentes preenchidos com gel de polímero + Sildenafil 0.015%. Para os dentes preenchidos com gel de polímero os resultados em relação à camada de odontoblastos, foram heterogêneos, esta ora se apresentando de forma organizada, ora de forma desorganizada; os vasos sanguíneos mostraram-se ingurgitados, e o infiltrado inflamatório foi de intensidade moderada a severa, sendo a última coincidente nas seções que apresentaram a camada de odontoblastos desorganizada (Tabela 2; Figura 3). Com este tratamento necrose pulpar foi detectada.

Tabela 2: Preparo cavitário seguido de capeamento pulpar indireto com CaOH₂, gel de polímero, Sildenafil 0.015%, Sildenafil 0.15% e L-NAME 10⁻⁴ mol/L. Os animais foram sacrificados 3 dias após o capeamento pulpar indireto e restaurados temporariamente com CIV.

	CaOH ₂	Gel de Polímero	Sildenafil 0.015%	Sildenafil 0.15%	L-NAME 10 ⁻⁴ mol/L
Camada de Odontoblastos					
Organizada Desorganizada	Organizada	Organizada Desorganizada	Organizada	Desorganizada	Organizada
Vasos Sanguíneos					
Presença Ingurgitamento	Presente Ingurgitado	Presente Ingurgitado	Presente Ingurgitado	Presente Ingurgitado	Presente Ingurgitado
Infiltrado Inflamatório					
Tipo Intensidade	PMN Leve	PMN Moderado (25%) Severo (50%)	PMN Leve	PMN Severo	PMN Moderado
Necrose	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente

A maior alteração da polpa dental observada no experimento II foi aquela resultante do preenchimento com gel de polímero + Sildenafil 0.15%. Observou-se camada de odontoblastos desorganizada com vasos sanguíneos ingurgitados, infiltrado inflamatório severo e predominância de células PMN. Necrose e abcesso foram observados em todos os dentes avaliados (Tabela 2; Figura 3). A aplicação do L-NAME, aparentemente não alterou o aspecto da polpa quando comparados àqueles tratados com CaOH₂, com exceção do infiltrado inflamatório que mostrou-se de intensidade moderada.

Como salientado, as colorações Picrosirius hematoxilina e Azan, foram realizadas para avaliar a presença de fibras colágenas. Em relação à coloração Picrosirius hematoxilina, observou-se que o capeamento pulpar indireto com gel de polímero, CaOH₂, Sildenafil 0.015% e L-NAME 10⁻⁴ mol/L não alterou a distribuição ou o aspecto das fibras colágenas nas secções analisadas. Com a

proteção pulpar com Sildenafil 0.15%, a observação de fibras colágenas ficou comprometida, provavelmente devido a presença de necrose tecidual.

4. DISCUSSÃO

Primeiros molares de ratos têm sido utilizados como modelo para o estudo experimental do preparo cavitário, desde que as respostas histológicas e fisiológicas são muito semelhantes às aquelas observadas no dente humano (DAMMASCHKE, 2010). A produção de NO na polpa dental pode resultar da atividade das NOS presentes no endotélio e odontoblastos (MEI et al., 2007), os últimos podendo indiretamente levar a alterações no fluxo sanguíneo local em resposta a proteção pulpar indireta (KISPÉLYI et al., 2005). Neste estudo, foi realizado preparo cavitário *in vivo* em primeiros-molares de ratos, seguido de proteção pulpar indireta para se comparar os efeitos do CaOH₂ com gel de polímero acrescido de fármacos que interferem com a neurotransmissão nitrérgica, como o Sildenafil e o L-NAME. A resposta inflamatória mais intensa foi observada após três dias de preparo cavitário. Aparentemente, o uso do gel de polímero intensificou a resposta inflamatória. Efeito dual foi observado com o gel acrescido de Sildenafil; enquanto em baixa concentração o Sildenafil (0.015%) promoveu um efeito positivo sobre o estado pulpar, em concentração maior (0,15%) o Sildenafil promoveu o aparecimento de resposta inflamatória severa e necrose pulpar.

É bem estabelecido que o preparo cavitário pode gerar estímulos mecânicos e térmicos com intensidade suficiente para agredir a polpa dental e os tecidos circundantes, através da liberação de enzimas e outras substâncias imunorreativas, o que leva ao desenvolvimento de um processo inflamatório local que visa restabelecer a integridade pulpar (HAUG et al., 2001). De acordo com D'SOUZA et al. (1995), o preparo cavitário, através da exposição dos túbulos dentinários, provoca uma alteração na continuidade da camada de odontoblastos a qual inicia-se 6h após o procedimento e completa-se aproximadamente no quarto dia após a agressão, com o restabelecimento da homeostasia local. Os presentes resultados estão de acordo com D'SOUZA et al. (1995), desde que três dias após o preparo cavitário observou-se infiltrado

inflamatório moderado, com camada de odontoblastos desorganizada. Sete dias após o preparo, no entanto, o padrão histológico apresentou-se reorganizado, com infiltrado inflamatório leve.

Sistemas hidrogéis podem promover a interação das cadeias poliméricas com a estrutura dental utilizando o princípio da bioadesão, prolongando o tempo de retenção da formulação dentro do preparo (JONES et al., 2000; 2009). O íntimo contato entre a forma farmacêutica e o tecido de absorção pode resultar em alta concentração de fármaco em uma área localizada (AHUJA et al., 1997). Em estudos prévios, o sistema polimérico binário formado por P407 e C934P, apresentou alta capacidade de carregamento de fármaco, boa bioadesão, sabor agradável, além de possibilitar a liberação de fármaco por um tempo prolongado (JONES et al., 2009). No presente trabalho, esse sistema produziu reação inflamatória mais severa se comparada àquela observada nos dentes submetidos apenas ao preparo cavitário. Este resultado foi inesperado, desde que, acredita-se ser o gel desprovido de atividade biológica. É possível entretanto, que a presença de trietanolamina no sistema polimérico (P407, C934P e trietanolamina), possa ter induzido a ação irritante observada. Considerando a inércia dos polímeros e a pequena quantidade de trietanolamina utilizada (apenas para corrigir o pH) (JONES et al., 2009), estudos devem ser realizados para avaliar a influência desses compostos na ação irritante observada.

Nos tratamentos conservadores da polpa, o CaOH_2 é reconhecido por preservar a vitalidade pulpar, agindo através de variados mecanismos como: atividade antimicrobiana, capacidade de dissolver tecidos, inibição da reabsorção dental e indução de reparo por formação de tecido duro (HU et al., 1998; SIQUEIRA; LOPES, 1999; TZIAFAS et al., 2005). Além disso, o CaOH_2 regula a liberação de fatores endógenos envolvidos no processo de reparo e neutraliza os ácidos produzidos na resposta inflamatória, induzindo a cura e regeneração tecidual (HU et al., 1998). No presente trabalho, o capeamento pulpar com CaOH_2 mostrou efeitos positivos sobre a vitalidade pulpar; a camada de odontoblastos apresentou-se organizada e o infiltrado inflamatório foi de intensidade leve, confirmando a indicação clínica deste procedimento. Curiosamente, o capeamento pulpar com Sildenafil resultou em efeitos

opostos, dependendo da concentração utilizada. O grupo tratado com o Sildenafil 0.015% foi qualitativamente semelhante ao grupo que recebeu CaOH₂, onde observou-se um efeito positivo sobre a vitalidade pulpar, enquanto que, uma severa resposta inflamatória e necrose foram observadas com o uso de Sildenafil 0.15%. A razão pela qual a concentração maior de Sildenafil causou aumento do processo inflamatório é desconhecida. É possível que a ação positiva do Sildenafil sobre o processo inflamatório, envolva sua ação vasodilatadora. Talvez, com o aumento excessivo do fluxo sanguíneo induzido pelo Sildenafil, uma quantidade maior de mediadores da inflamação, tenha atingido o local do reparo, exacerbando o processo inflamatório e levando a necrose tecidual. Neste sentido, papel dual para o sistema NO sobre o processo inflamatório tem sido proposto (SILVA et al., 2008). É esperado que o NO liberado pelas NOS constitutivas, em baixa concentração, exerça um efeito antiinflamatório através da inibição da migração de leucócitos e ação antiagregante plaquetária. Já em altas concentrações, ou quando liberado maciçamente pelas iNOSs, o NO intensifica o processo inflamatório (DI NARDO DI MAIO et al., 2004).

Os resultados obtidos com o L-NAME foram semelhantes aos obtidos com o gel de polímero, com manutenção da camada de odontoblastos organizada e presença de um infiltrado inflamatório moderado. Esperava-se que, devido as propriedades farmacológicas do L-NAME, houvesse um aumento da resposta da resposta inflamatória. O L-NAME é reconhecido por causar significativa diminuição do fluxo sanguíneo pulpar (KISPÉLYI et al., 2005), o que, associado a já pequena circulação sanguínea presente na polpa poderia prejudicar ainda mais a capacidade da resposta pulpar. No entanto, resultados experimentais mostram que a administração isolada de L-NAME intra-artéria lingual em gatos, falha em alterar o fluxo sanguíneo pulpar. Porém uma alteração significativa somente foi observada quando o L-NAME foi administrado juntamente com outros vasodilatadores, como a substância P (HSU et al., 2003).

Quando avaliada a presença de fibras colágenas, não se observou diferença qualitativa em relação aos dentes preenchidos com gel de polímero, CaOH₂, Sildenafil 0.015% ou L-NAME. Com o Sildenafil 0.15% não foi possível

avaliar as fibras colágenas, por causa do intenso infiltrado inflamatório, e o estado de necrose apresentado. Quando intensa reação inflamatória ocorre, as enzimas liberadas hidrolisam as fibras colágenas presentes na polpa, as quais perdem suas formas originais. Por isso, nos dentes tratados com Sildenafil 0.15% a presença e distinção das fibras colágenas ficaram comprometidas.

Este é um estudo pioneiro que usa o sistema gel de polímero acrescido de substâncias que interferem com a neurotransmissão do NO na proteção pulpar indireta. Os resultados obtidos mostram que a concentração de NO local pode ser determinante na resposta pulpar, desde que Sildenafil 0.015% promova diminuição do processo inflamatório e melhora do estado pulpar, enquanto que Sildenafil 0.15% resulta em intensa inflamação e necrose. Estudos futuros para a verificação dos efeitos do gel de polímero na polpa dental, bem como dos prováveis mecanismos moleculares relacionados aos efeitos do Sildenafil na proteção pulpar indireta deverão ser conduzidos.

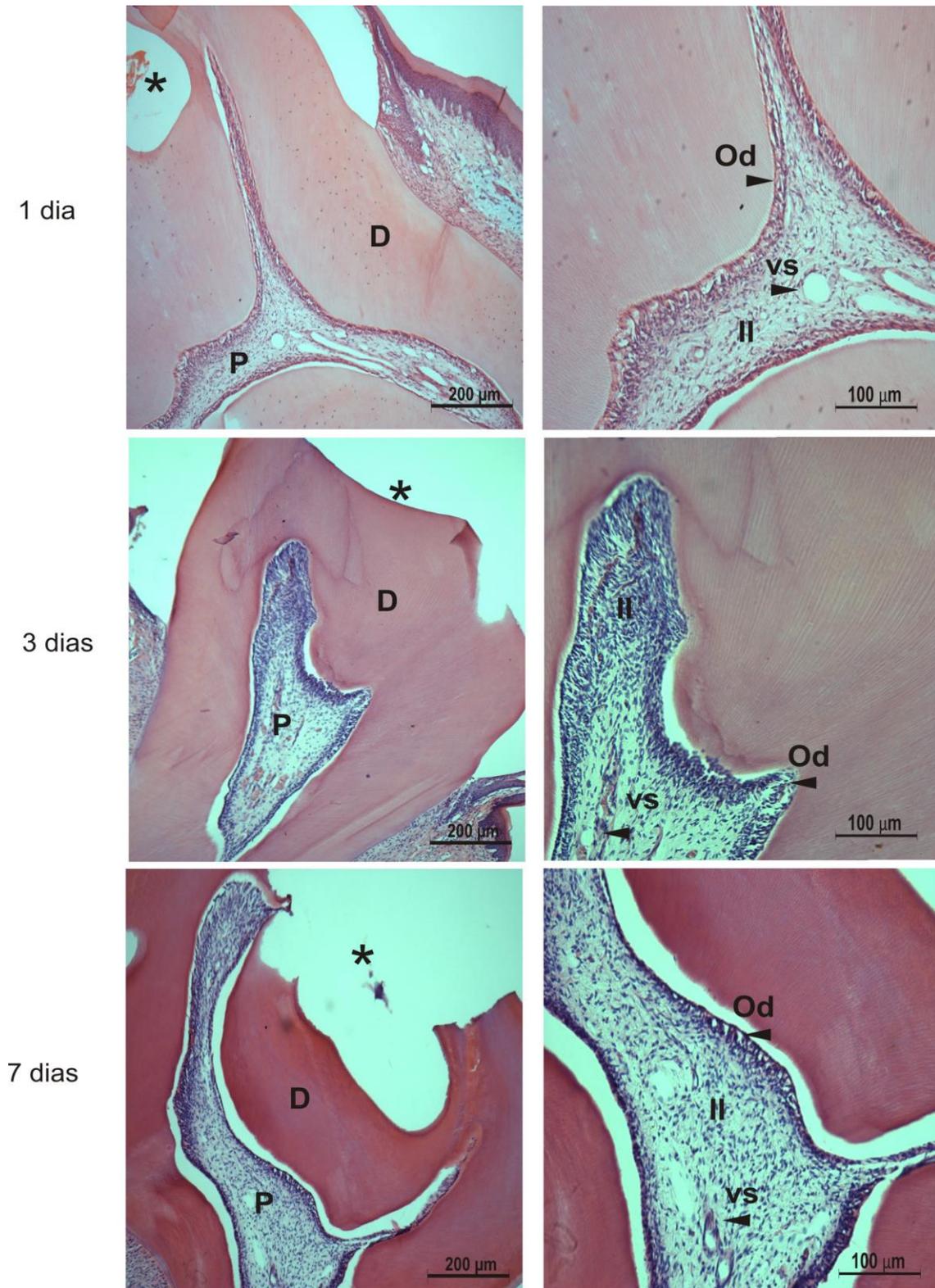


Figura 2. Fotomicrografias ilustrativas de polpas dentais coradas por hematoxilina eosina, de primeiros molares de ratos, 1, 3 ou 7 dias após preparo cavitário. Observa-se infiltrado inflamatório (II) moderado e camada de odontoblastos (Od) desorganizada 3 dias após o preparo cavitário. Preparo cavitário (*); Dentina (D); Polpa (P) e vaso sanguíneo (VS).

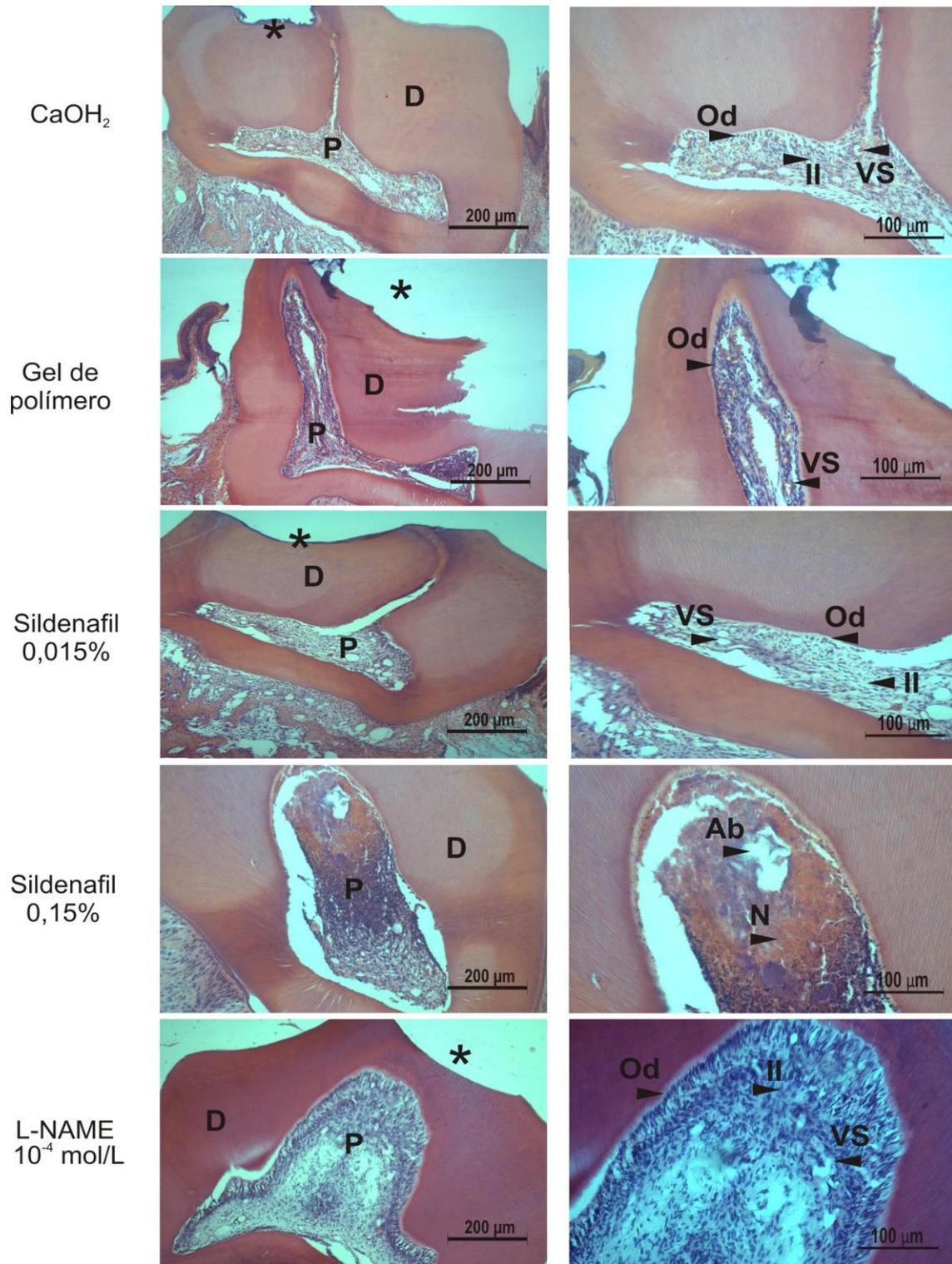


Figura 3. Fotomicrografias ilustrativas de polpas dentais de primeiros molares de ratos, 3 dias após preparo cavitário e proteção pulpar indireta com hidróxido de cálcio (CaOH₂), gel de polímero e gel de polímero acrescido de Sildenafil ou N-nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME) 10⁻⁴ mol/L. Observe infiltrado inflamatório intenso e presença de abscesso (Ab) e necrose (N) nos dentes preenchidos com gel de polímero e Sildenafil 0,15%, respectivamente.

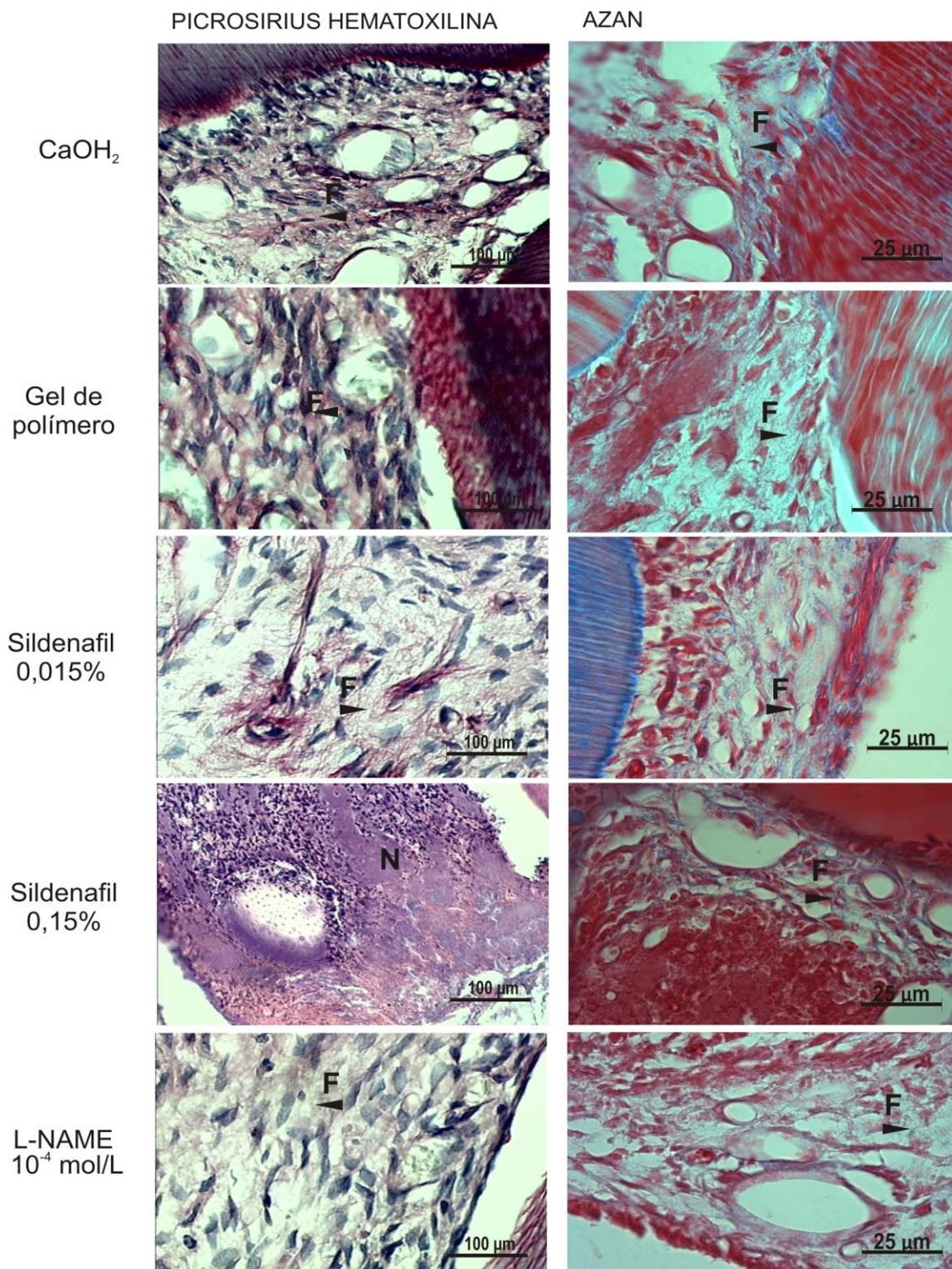


Figura 4. Fotomicrografias ilustrativas de polpas dentais de primeiros molares de ratos, 3 dias após preparo cavitário e proteção pulpar indireta. As setas indicam fibras colágenas (F) em arranjo paralelo, em vermelho (coloração Picrosirius hematoxilina) ou novas fibras colágenas coradas em azul (coloração Azan). Observe que a necrose impede a verificação das fibras de colágeno em dentes capeados com Sildenafil 0.15%.

5. CONCLUSÃO

O processo inflamatório mais intenso foi observado após 3 dias do preparo cavitário. O Sildenafil 0.015% e CaOH₂ mostraram efeitos semelhantes sobre o capeamento pulpar indireto, reduzindo o processo inflamatório quando comparado ao gel de polímero. O Sildenafil 0.15% provocou intensa reação inflamatória com necrose pulpar. O L-NAME provocou processo inflamatório moderado comparado ao CaOH₂. Não foram observadas alterações significativas em relação à presença de fibras colágenas em resposta aos diferentes tratamentos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARNOLD, W. P.; MITTAL, C. K.; KATSUKI, S.; MURAD, F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3'5'-cyclic monophosphatase levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci.* v.74, p.3203-3207, 1977.
2. AHUJA, A.; KHAR, R. K.; ALI, J. Mucoadhesive drug delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm.* v.23, p.489-515, 1997.
3. BERGGREEN, E.; HEYERAAS, K. J. The role of sensory neuropeptides and nitric oxide on pulpal blood flow and tissue pressure in the ferret. *J Dent Res.* v.78, p.1535-1543, 1999.
4. BREDT, D. S.; HWANG, P. M.; SNYDER, S. H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature.* v.347, p.768-770, 1990.
5. BRUSCHI, M. L.; JONES, D. S.; PANZERI, H.; GREMIA, M. P. D.; FREITAS, O.; LARA, E. H. G. Semisolid systems containing propolis for the treatment of periodontal disease: In vitro release kinetics, syringeability, rheological, textural, and mucoadhesive properties. *J Pharm Sci.* v.96, n.8, p.2074-2089, 2007.
6. CARMIGNANI, M.; VOLPE, A. R.; BOSCOLO, P.; QIAO, N.; DI GIOACCHINO, M.; GRILLI, A. Catecholamine and nitric oxide systems as targets of chronic lead exposure in inducing selective functional impairment. *Life Sci.* v. 68, p.401-415, 2000.
7. DAMMASCHKE, T. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. *Lab Anim.* v.44, n.1, p.1-6, 2010.

8. DAMMASCHKE, T.; STRATMANN, U.; FISCHER, R. J.; SAGHERI, D. A histologic investigation of direct pulp capping in rodents with dentin adhesives and calcium hydroxide. *Quintessence*. v.4, n.4, p.62-71, 2010.
9. DECUP, F.; SIX, N.; PALMIER, B.; BUCH, D.; LASFARGUES, J. J.; SALIH, E.; GOLDBERG, M. Bone sialoprotein-induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. *Clin Oral Invest*. v.4, p.110-119, 2000.
10. DI NARDO DI MAIO, F.; LOHINAI, Z.; D'ARCANGELO, C.; ESPOSITO DE FAZIO, P.; SPERANZA, L.; DE LUTIIS, M. A.; PARTRUNO, A.; GRILLI, A.; FELACO, M. Nitric oxide synthase in healthy and inflamed human dental pulp. *J Dent Res*. v.83, n., p.312-316, 2004.
11. D'SOUZA, R. N.; BACHMAN, T.; BAUMGARDNER, K. R.; BUTLER, W. T.; LITZ, M. Characterization of cellular responses involved in reparative dentinogenesis in rat molars. *J Dent Res*. v.74, p.702-709, 1995.
12. DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. Rio de Janeiro. v.39, n.4, p.343-450, 2003.
13. FAN, W. Involvement of NOS/NO in the development of chronic dental inflammatory pain in rats. *Brain Res Rev*. v.59, p.324-332, 2009.
14. FARHAD, A.; MOHAMMADI, Z.; IRAN, E. Calcium hydroxide: a review. *Int Endod J*. v.55, p.293-301, 2005.
15. GOLDBERG, M.; FARGES, J. C.; LACERDA-PINHEIRO, S.; SIX, N.; JEGAT, N.; DECUP, F.; SEPTIER, D.; CARROUEL, F.; DURAND, S.; CHAUSSAIN-MILLER, C.; DENBESTEN, P.; VEIS, A.; POLIARD, A. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacol Res*. v.58, n.2, p.137-47, 2008.
16. HARGREAVES, K. M.; GOODIS, H. E. Seltzer and Bender's Dental Pulp. China: Quintessence. 2002. 500p.
17. HAUG, S. R.; BERGGREEN, E.; HEYERAAS, K. J. The effect of unilateral sympathectomy and cavity preparation on peptidergic nerves and immune cells in rat dental pulp. *Exp Neurol*. V.169:182-190, 2001.
17. HU C-C, ZHANG, C.; QIAN, Q.; TATUM, N. B. Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. *J Endod*. v.24, n.11, p.744-751, 1998.
18. HUNG, C. T.; ALLEN, F. D.; POLLACK, S. R.; BRIGHTON, C. T. Intracellular stores and Ca⁺² extracellular Ca⁺² are required for the real-time Ca⁺² response of bone cells experiencing fluid flow. *J Biomech*. v.29, p.1411-1417, 1996.

19. JONES, D. S.; BRUSCHI, M. L.; FREITAS, O.; GREMIÃO, M. P. D.; LARA, E. H. G.; ANDREWS, G. P. Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of hermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. *Int J Pharm.* v.372, p.49–58, 2009.
20. JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; BROWN, A. F.; COULTER, W. A.; MCCLELLAND, C.; IRWIN, C. R. Design, characterization and preliminary clinical evaluation of a novel mucoadhesive topical formulation containing tetracycline for the treatment of periodontal disease. *J Control Rel.* v.67, p.357-368, 2000.
21. JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* v.11, n.4, p. 447-455, 1979.
22. KEREZOUZDIS, N. P.; OLGART, L.; FRIED, K. Localization of NADPH-diaphorase activity in the dental pulp, periodontium and alveolar bone of the rat. *Histochemistry.* v.100, p.319-322, 1993b.
23. KIBA, W.; IMAZATO, S.; TAKAHASHI, Y.; YOSHIOKA, S.; NAKANO, T. Efficacy of polyphasic calcium phosphates as a direct pulp capping material. *J Dent.* Jul 5, 2010. *In press.*
24. KISPÉLYI, B.; LOHINAI, Z.; IVÁNYI, I.; MIRZAHOSSEINI, S.; NYÁRASDY, I.; ROSIVALL, L. The effect of local nitric oxide synthase inhibition on the diameter of pulpal arteriole in dental Bond material-induced vasodilation in rat. *Life Sciences.* v.77, p.1367-1374, 2005.
25. LAW, A. S.; BAUMGARDNER, K. R.; MELLER, S. T.; GEBHART, G. F. Localization and change in NADPH-diaphorase reactivity and nitric oxide synthase immunoreactivity in rat pulp following tooth preparation. *J Dent Res.* v.78, p.1585-1595, 1999.
26. LOHINAI, Z.; BALLA, I.; MARCZIS, J.; VASS, Z.; KOVÁCH, A. G. B. Evidence for the role of nitric oxide in the circulation of the dental pulp. *J Dent Res.* v.78, n.8, p.1501-1506, 1995.
27. LOHINAI, Z.; SZÉKELY, A. D.; BENEDEK, P.; CSILLAG, A. Nitric oxide synthase containing nerves in the cat and dog dental pulp and gingival. *Neurosci Lett.* v.16, n.227, p.91-94, 1997.
28. MEI, YU. FENG.; YAMAZA, T.; ATSUTA, I.; DANJO, A.; YAMASHITA, Y.; KIDO, M. A.; GOTO, M.; AKAMINE, A.; TANAKA, T. Sequential expression of endothelial nitric oxide synthase, inducible nitric oxide synthase, and nitrotyrosine in odontoblasts and pulp cells during dentin repair after tooth preparation in rat molars. *Cell and Tissue Research.* v.328, p.117-127, 2007.

29. MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacolog Rev.* v.43, p.109-142, 1991.
30. PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric Oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* v.327, p.524-526, 1987.
31. RAMANI, G. V.; PARK, M. H. Update on the clinical utility in the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Drug Des Devel Ther.* v.25, n.4, p.61-70, 2010.
32. RUTHERFORD, B.; FITZGERALD, M. A new biological approach to vital pulp therapy. *Crit Rev Oral Biol Med.* v.6, n.3, p.218-29, 1995.
32. SIQUEIRA, J. F.; LOPES, H. P. Mechanisms of Antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J.* v.32, p.361-369, 1999.
33. SIX, N.; LASFARGUES, J. J.; GOLDBERG, M. Differential repair responses in the coronal and radicular areas of the exposed rat molar pulp induced by recombinant human bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1). *Arch Oral Bio.* v.47, p.177-178, 2002.
34. TZIAFAS, D.; SMITH, A. J.; LESOT, H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent.* v.28, p.77-92, 2000.
35. VIER-PELISSER, V.; FIGUEIREDO, M. A. Z.; CHERUBINI, K.; BRAGA FILHO, A.; FIGUEIREDO, J. A. P. The effect of head-fractioned teletherapy on pulp tissue. *Int Endod J.* v.40, p.859-865, 2007.
36. YASUHARA, R.; SUZAWA, T.; MIYAMOTO, Y.; WANG, X.; TAKAMI, M.; YAMADA, A.; KAMIJO, R. Nitric oxide in pulp cell growth, differentiation, and mineralization. *J Dent Res.* v.86, n.2, p.163-168, 2007.
37. Y. – Y. HSU.; Y.-T. JOU.; WONG, R.; KARABUCAK, B.; SIMCHON, S.; KIM, S. Effect of nitric oxide synthase inhibitor (L-NAME) on substance P-induced vasodilatation in the dental pulp. *Int Endod J.* v.36, p.840-847, 2003.