

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Aline Cristina Silva

**Efeitos biológicos do tratamento de condicionamento radicular em dentes
afetados periodontalmente - análise *in vitro*.**

Orientador: Prof. Dr. Denildo de Magalhães

Uberlândia-MG
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Aline Cristina Silva

Efeitos biológicos do tratamento de condicionamento radicular em dentes afetados periodontalmente - análise *in vitro*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Odontologia. Área de Concentração: Clínica Odontológica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Denildo de Magalhães

Uberlândia-MG
2013

Aline Cristina Silva

Efeitos biológicos do tratamento de condicionamento radicular em dentes afetados periodontalmente - análise *in vitro*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Odontologia. Área de Concentração: Clínica Odontológica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Denildo de Magalhães

Banca Examinadora:

Prof.Dr. Denildo de Magalhães – Faculdade de Odontologia –UFU

Prof^a.Dr^a. Camilla Christian Gomes Moura– Faculdade de Odontologia –UFU

Prof^a.Dr^a. Letícia Resende Davi– Faculdade de Odontologia –UFU

Uberlândia-MG

2013

DEDICATÓRIA

À **Deus**, primeiramente. Pois sem ti, nada disso teria ocorrido. Agradeço por me fazer aprender a superar meus limites, por aprender a confiar e acreditar em mim. Por ter um Deus vivo que opera incansavelmente entre nós. Que está sempre presente, independente de circunstâncias, dia, hora. E por ter tido fé em todos os momentos, até mesmo naqueles que pareciam ser impossíveis.

A minha **família**, meu pai Eurípedes, minha mãe Nilda, meu irmão Júnior, minha cunhada Sâmya, e minha tão esperada sobrinha Valentina, por acreditarem em mim, me dar forças sempre, me incentivar aos estudos, me escutarem, me apoiarem. Obrigada por cada dia, em que a presença de vocês foi fundamental para mim. Amo vocês.

Ao meu **namorado** Lucas, por ter chegado no momento certo em minha vida, por meio do apoio de sempre, pelo carinho, atenção e dedicação a mim. Tenho certeza que agora você entende um pouco de pesquisa, por tanto me ouvir, e tanto compartilhar junto de mim, tantos momentos. Obrigado por entender tantas vezes que não pude estar com você, por ter que me dedicar aos estudos. Você é muito especial para mim.

Aos meus **familiares**, pois sei que mesmo não estando sempre presentes, sempre torceram pelo meu sucesso. Obrigada por cada palavra de carinho e de superação. Sei que sempre acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao professor **Dr. Denildo de Magalhães**, por ter me cedido a grande oportunidade de conviver durante esses anos, com sua tamanha experiência, seu profissionalismo. Agradeço por ter acreditado em mim, e fazer com que eu vivesse novas experiências, novas vitórias. Pessoas como você merecem ser eternamente lembradas. Obrigada pela chance única de me tornar uma pessoa melhor, não só profissionalmente, como também, pessoalmente. Com certeza jamais me esquecerei de sua amizade, seu profissionalismo. Para mim você é e sempre será um amigo. Você com certeza é um exemplo para mim.

A **Profª. Ms. Priscilla Barbosa F. Soares**, foi essencial nesta etapa da minha vida. Foi como uma mãe, que cuidou de mim desde o início. Você ficará marcada para sempre em meu coração, você é um exemplo de mãe, professora, aluna. Sua dedicação é de impressionar. Continue assim.

A **Profª. Drª. Camilla Moura**, com você aprendi que lutar é vencer. Só tenho a agradecer, por tantas coisas novas, experiências que obtive com você. Aprendi com você a nunca desistir dos sonhos e sim, sempre persistir.

A **Profª. Drª . Letícia Davi**, obrigada pelo seu jeito carinhoso e acolhedor, você fez diferença na minha formação.

Ao **Prof. Dr. Carlos**, obrigada por me acolher tão bem na pós-graduação. E por mesmo sem tempo, ainda reservar um dia para opinar sobre meu trabalho, e me ajudar. Serei eternamente grata.

Ao **Prof. Ms. Helder**, agradeço pelas inúmeras oportunidades dadas em sua escola de pós-graduação, pelas triagens, pelos cursos onde estive presente em monitorias, aulas teóricas, por ter me levado a caminhos diferentes, com novas experiências, obrigada por acreditar em mim e em meu trabalho.

A Prof^a. Ms. **Marina**, obrigada por todos os momentos que esteve presente, sempre com disponibilidade, carinho e paciência. Agradeço pelas palavras de otimismo, pelos bons conselhos, por sobretudo acreditar em mim. A cada dia tenho aprendido mais com você. Você é uma pessoa que admiro muito e para mim se tornou uma amiga.

A toda equipe **HD Ensinos Odontológicos**, por todos os anos que estive presente buscando conhecimentos, experiências, que me levaram hoje a ser quem sou. Nunca esquecerei de todos vocês ! Tenho a convicta certeza que esse novo caminho na área acadêmica está apenas no início.

A minha irmã de orientação **Juliana**, como foi bom ter você ao meu lado, durante todo este tempo, dividindo sonhos, inseguranças e também vitórias.

Obrigada por estar sempre ao meu lado.

A minha parceira de especialização **Michelle**, obrigada pois desde o início sempre me apoiou a entrar no processo seletivo do mestrado. E hoje, ao concluir esta etapa não poderia deixar de falar de você, uma grande amiga que conheci e admiro.

As minhas amigas do laboratório **Fabiana, Manuella, Fabiane**, por estarem sempre presente em minha vida, e nunca me desampararem, mesmo no fim. Muitas de vocês, mesmo com tanta coisa para fazerem, nunca me deixaram só. O que fizeram por mim, é algo inexplicável, que vou guardar para sempre no meu coração. Em especial a Fabiana, que literalmente deu o seu sangue como doadora para a realização deste trabalho. A Fabiane, esteve comigo durante toda a fase experimental, até tarde da noite, com a maior boa vontade, valeu garota! E a Manuella por ter me cedido as fotos, tantas informações que só vieram a acrescentar em meu trabalho.

A minha amiga Ana Luíza, obrigada por dividir comigo os primeiros momentos do mestrado, tenho certeza que juntas descobrimos e aprendemos muitas coisas. Bom saber que conheci pessoas maravilhosas como você.

A minha aluna e amiga de Iniciação Científica **Jéssica**, por termos passado juntas tantos momentos, que com certeza ficaram marcados tanto para mim quanto para você. Com você aprendi que relações como mestrandos e aluno de iniciação podem ser muito mais que belos parceiros profissionais, mas sim eternos amigos. Agradeço sobretudo pela sua amizade, carinho, atenção. Por viver o mestrado junto comigo. Noites no lipo, cortando dentes, jamais ficaram esquecidas.

A técnica do laboratório **Francielle**, o que fez por mim, nem sei se teria como agradecer. No momento mais difícil, você apareceu como uma luz, com certeza Deus enviou você, para fazer algo que até então não estávamos conseguindo realizar. Sua boa vontade, sua dedicação, seu otimismo, nos levaram a ter excelentes resultados. Só tenho que agradecê-la por tudo.

Aos **professores da FOUFU**, obrigada por cada dia em que estive presente na vida de vocês. Vocês me deram a oportunidade de amadurecer, crescer profissionalmente, pessoalmente. Com certeza, hoje finalizo o curso como outra pessoa, esses dois anos, serão marcados para sempre em minha vida.

A toda 11º **turma de pós-graduação** que entre tantos seminários, e dificuldades, aprendemos uns com os outros, nos ajudamos, nos tornamos amigos, e tenho certeza que todos nós colheremos muitos frutos desta linda jornada e muito sucesso a cada um de vocês.

A **PROPP**, pelo apoio financeiro para a compra dos materiais do trabalho.

A **FOUFU** e **UFU**, agradeço pela formação e estrutura disponibilizada, juntamente aos laboratórios **LIPO E LABIOCEL** , onde pude felizmente realizar todos os experimentos e por todos que pude conhecer.

A **todos** que direta ou indiretamente contribuiram para a realização deste sonho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1. Periodonto.....	19
2.2. Doença Periodontal.....	21
2.3. Terapia Regenerativa.....	22
2.4. Dentina.....	36
3. PROPOSIÇÃO	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1. Seleção dos dentes.....	41
4.2. Preparo dos dentes e obtenção dos blocos de dentina	41
4.3. Protocolo de tratamento radicular	43
4.4. Tratamento químico das superfícies radiculares.....	43
4.5. Presença de smear layer e resíduos dos produtos - Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	44
4.6. Cultura de células	46
4.7. Determinação da viabilidade celular	49
4.8. Adesão celular de fibroblastos - Análise por MEV	50
4.9. Adesão dos componentes sanguíneos - Análise por MEV	51
5.0. Análise estatística	53
5. Resultados	54
6. DISCUSSÃO	66

7. CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS.....	74
ANEXOS	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL – MICROLITROS

BCRJ - BANCO DE CÉLULAS DO RIO DE JANEIRO

DMEM – MEIO DE CULTURA DE EAGLE MODIFICADO POR DULBECCO

DMSO - DIMETILSULFÓXIDO

EDTA- ÁCIDO ETILENODIAMINOTETRACÉTICO

HFF- LINHAGEM DE CÉLULAS DA PELE

HMDS- HEXAMETILDISSILAZANO

KV- KILOVOLTS

MEV - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

mm – MILÍMETROS

MTT - 3 - (4,5-DIMETIL-2-IL TIAZOL) -2,5-DIFENILTETRAZOLIM BROMETO

OSO₄- TETRÓXIDO DE ÓSMIO

PBS- SOLUÇÃO TAMPÃO DE FOSFATOS

PELET - CÉLULAS DECANTADAS

RPM - ROTAÇÕES POR MINUTO

SFB - SORO FETAL BOVINO

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar as modificações nas superfícies radiculares após a aplicação de diferentes agentes químicos, e sua influência na inserção de rede de fibrina e fibroblastos. De 96 dentes incisivos anteriores humanos, extraídos devido doença periodontal severa, foram obtidos 192 blocos de dentina (3x3x1 mm) da superfície vestibular e lingual e aleatoriamente divididos em seis grupos: controle, que não receberam tratamento, raspagem e alisamento radicular (RAR) - superfície radicular foi raspada e alisada com curetas Gracey, Ácido cítrico - RAR + ácido cítrico 30% por 5 min; EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) - RAR + gel de EDTA 24% por 1 min; Tetraciclina cápsula – RAR + solução obtida por dissolução de uma cápsula de 500 mg de tetraciclina em 2 ml de solução salina por 3 minutos; Tetraciclina gel - RAR + 50 mg / mL de tetraciclina gel por 1 min. Após o tratamento, as amostras de dentina foram analisadas utilizando 4 metodologias diferentes: 1- o nível de desmineralização e de resíduos do produto (n = 9); 2- a adesão das componentes do sangue no tratamento de superfície após 20 min (n = 9); 3- a inserção de fibroblasto após 24 horas (n = 9), que foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), e 4- o metabolismo celular após 4h (n = 5), o ensaio com metiltetrazólio (MTT) foi utilizado. Ácido cítrico, EDTA e tetraciclina gel removeram completamente, “smear layer” e “smear plug” na superfície radicular, resultando em adequada desmineralização. Tetraciclina cápsula produziu grande resíduos de tetraciclina com áreas severas de desmineralização na superfície de dentina radicular. Grupos Tetraciclina gel e EDTA tiveram maior inserção de fibroblastos que os outros grupos experimentais. A maior média de adesão do coágulo sanguíneo pontuada foi observada em raízes tratadas com a tetraciclina gel, enquanto que, a menor pontuação foi observada em raízes tratadas com tetraciclina cápsula. Estes resultados demonstram que a desmineralização da superfície pelo EDTA e pela tetraciclina gel removeram a smear layer que cobria a superfície da dentina e promoveram adesão da rede de fibrina e inserção de células dos fibroblastos. A Tetraciclina cápsula demonstrou desempenho menos efetivo em todos os parâmetros testados.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the root surfaces modifications after the application of different chemicals agents, and their influence on the attachment of a fibrin network and fibroblasts. From 96 anterior mandibular human incisor teeth, extracted due to severe periodontal disease, were obtained 192 dentin blocks (3x3x1 mm) of buccal and lingual surface and randomly divided into 6 groups: Control- control group, which received no treatment; Root surface scaling and root planing (SRP) - root surface was scaling and root planning with Gracey curetes; Citric acid - SRP + 30% citric acid 5 min; EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) - SRP + 24% EDTA gel for 1 min; Tetracycline capsule - SRP + for 3 min with a solution obtained by dissolving one 500 mg capsule of tetracycline in 2 mL of saline solution; Tetracycline gel - SRP + 50 g/mL tetracycline gel for 1 min. After dentin treatment the specimens were analyzed using 4 methodologies: 1- the demineralization level and residues of the product (n = 9); 2- the adhesion of blood components after 20 min of surface treatment (n = 9); 3- the fibroblast attachment after 24h (n = 9), were analyzed by scanning electron microscopy (SEM); and 4- the cell metabolism after 4h (n = 5) the methyltetrazolium (MTT) assay was used. Citric acid, EDTA and Tetracycline gel removed completely smear layer and smear plug on root surface, resulted in adequate demineralization .Tetracycline capsule produced great tetracycline residues with several demineralization areas on root dentin surface. Tetracycline gel and EDTA groups had more fibroblast fixation than other experimental groups. The highest mean blood clot adhesion score was observed in roots treated with a tetracycline gel, whereas, the least score was observed in roots treated with tetracycline capsule. These results demonstrated that EDTA and Tetracycline gel surface demineralization removed the smear layer over dentin surface and promoted adhesion of a fibrin network and fibroblast cells attachment. The Tetracycline capsule demonstrated less effective performance in all parameters tested.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O termo “Doença Periodontal” refere-se a doença que incide sobre os tecidos de revestimento e sustentação, bem como sobre o próprio dente (Socransky, 1977), levando a perda de inserção dental e a contaminação cementária/radicular (Adriaens et al., 1988; Oda & Carvalho, 2004).

A placa bacteriana é o fator etiológico primário da doença periodontal (Kina et al., 2008). O resultado da petrificação da placa dental é a formação do cálculo, provindos da saliva e dos fluidos creviciares, depositados entre e dentro dos remanescentes de microorganismos, uma vez mineralizado, é capaz de se aderir ao cimento e à superfície dentinária. (White, 1997).

A manifestação clínica destas periodontopatias está relacionada com aumento considerável de bactérias gram-negativas tais como: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides forsythus*, *Capnocytophaga spp* e *Veillonella parvula*, constituídas por endotoxinas, denominadas LPS, se fixam à superfície do cimento e da dentina, e tem propriedades patogênicas, por atuarem como agente inflamatório, percebida na composição da placa bacteriana, na saliva, no exsudato gengival e no tecido epitelial gengival (Aleo et al., 1974). Estas bactérias por sua vez, invadem os tecidos periodontais, sendo responsáveis pela destruição progressiva e, muitas vezes irreversível, das estruturas periodontais de sustentação, impedindo a inserção efetiva do tecido periodontal (Oda & Carvalho, 2004).

A eliminação de endotoxinas por meio de raspagem e alisamento radicular torna-se parte importante no processo de terapia periodontal (Oda & Carvalho, 2004), estudos têm indicado que o debridamento radicular, por si só, não remove de forma efetiva o cimento contaminado pelas endotoxinas bacterianas (Kina et al., 2008). Além disso, o procedimento de raspagem é capaz de promover a formação e a deposição de smear layer, também conhecida como camada de esfregaço, que pode atuar como barreira física entre os tecidos periodontais e a superfície radicular, inibindo a inserção do

tecido conjuntivo sobre a raiz dental e formando epitélio juncional longo (Polson & Michel, 1982; Isik et al., 2000; Baker et al., 2000).

Desta forma, o objetivo principal da terapia regenerativa é a inserção de células do tecido conjuntivo em áreas afetadas pela doença periodontal (Silvério et al., 2007), restaurando a forma e função originais de tecidos de suporte dental afetados pela doença periodontal (Amireddy et al., 2011). Portanto, após raspagem e alisamento radicular a superfície radicular deve ser condicionada pela aplicação tópica de substâncias químicas. Diferentes substâncias têm sido empregadas no tratamento das superfícies radiculares objetivando: eliminação de material citotóxico (Caffesse et al., 2000; Zaman et al., 2000) e limpeza da superfície dentinária (Isik et al., 2000), com descontaminação da superfície radicular pela: remoção de smear layer e de resíduos contaminantes (Kina et al., 2008), levando à exposição e desmineralização das superfícies (Martins et al., 2011; Shetty et al.; 2011) e exposição da matriz colágena de dentina ou cimento (Martins et al., 2011; Shetty et al., 2011), facilitando a inserção de células do tecido conjuntivo cicatricial à superfície radicular (Silvério et al., 2007), fato que otimiza a resposta cicatricial dos tecidos periodontais frente ao tratamento periodontal regenerativo (Isik et al., 2000 ; Amireddy et al., 2011).

Acredita-se que a biomodificação radicular tem o potencial de otimizar a regeneração dos tecidos periodontais por meio de mecanismos como indução da cementogênese, estabilização do coágulo de fibrina, interdigitação do colágeno do conjuntivo gengival com o da estrutura dental, otimização da adesão, viabilidade e crescimento de fibroblastos sobre superfícies dentinárias que tiveram a sua matriz colágena exposta (Fontanari & Sampaio, 2010).

Superfícies desmineralizadas aumentam a ligação da matriz protéica dentinária e estimulam a ligação e crescimento dos fibroblastos (Caffesse et al., 2000). A exposição de túbulos dentinários favorece a estabilização do coágulo e da rede de fibrina nos estágios iniciais do processo de cicatrização periodontal por meio do aumento da adesão de células sanguíneas e fibras na

superfície radicular (Leite et al., 2010; Amireddy et al., 2011). A exposição de fibras colágenas dentais podem promover a ativação e agregação plaquetária culminando na formação de rede de fibrina insolúvel, a qual pode atuar como arcabouço para adesão e proliferação de células do tecido conjuntivo (Steinberg & Willet, 1988; Baker et al., 2005).

Substâncias à base de tetraciclina e ácido cítrico têm efeito desmineralizador da superfície radicular, removendo smear layer, expondo os túbulos dentinários e a matriz colágena (Isik et al., 2000; Kina et al., 2008) postulada como atrativo para fibroblastos periodontais. O uso do EDTA em procedimentos periodontais e endodônticos objetiva a ampliação dos orifícios dos túbulos dentinários, sendo efetivo na remoção do smear layer, aumentando a permeabilidade além de apresentar efeito bactericida (Zaman et al., 2000; Martins et al., 2011). Além disso, o EDTA, por possuir um pH neutro, com agentes quelantes de cálcio, tem apresentado menor degradação do retalho e maior inserção de tecido conjuntivo (Blomlof et al., 1996).

Considerando as divergências na literatura e a falta de novos estudos controle *in vitro* e *in vivo*, gera-se a hipótese de que diferentes composições das soluções ácidas empregadas possa influenciar na forma de ação sobre a dentina radicular previamente planificada pela raspagem periodontal e consequentemente influenciando na capacidade de adesão de coágulo de fibrina e na adesão de células de fibroblastos nas superfícies radiculares.

Revisão da literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Periodonto

O periodonto saudável comprehende o conjunto de estruturas que suportam e revestem o dente. Composto por osso alveolar, ligamento periodontal, cimento radicular e gengiva marginal, que tem como objetivo manter a integridade funcional, estrutural e estética na cavidade bucal, dividindo-se em Periodonto de Proteção e de Sustentação (Ten Cate, 2001; Ferraris & Munõz, 2006).

O periodonto de proteção é o conjunto de estruturas envolvidas diretamente no revestimento do dente e estruturas de suporte, promovendo a separação do meio orgânico com o meio bucal atuando como barreira para suportar agressões provocadas por microorganismos. Constituído pelas seguintes estruturas: epitélio juncional, sulco gengival, gengiva marginal ou interdentária, ranhura gengival e gengiva inserida. Enquanto o periodonto de sustentação também denominado de aparelho de inserção, ancora os dentes aos maxilares, gerando base de sustentação para os tecidos de revestimento. Composto por cimento, ligamento periodontal e osso alveolar. Os tecidos de suporte do dente formam uma articulação fibrosa especializada, denominada gonfose, e se desenvolve a partir do folículo dental (Ten Cate, 2001; Lindhe, 2010).

Entre esses componentes encontra-se o cimento que é um tecido conjuntivo mineralizado avascular, localizado sobre a dentina radicular. Sua matriz é composta por 45 a 50 % hidroxiapatita (inorgânico) e 50 % colágeno e proteínas não colagenosas (orgânico). O colágeno do tipo I é o componente predominante constituindo cerca de 90 % da porção orgânica. As moléculas não colágenas são fosfatase alcalina, sialoproteína óssea, proteína da matriz da dentinária 1, sialoproteína da dentinária, fibrinectina, osteocalcina, osteonectina, osteopontina, proteoglicanas, proteolipídios, tenascina e outros fatores de crescimento. Durante a cementogênese, células do folículo dental revestem a superfície de dentina radicular à medida que se diferenciam em

cementoblastos. Inicialmente estas células depositam uma camada de matriz orgânica (cementóide) que posteriormente se mineraliza e simultaneamente, células do folículo diferenciam-se em fibroblastos, a quais produzem fibras do ligamento periodontal. A extremidade destas fibras ficam inseridas em cimento e osso alveolar sendo denominadas fibras de Sharpey (Ten Cate, 2001; Nanci, 2008).

As funções gerais do cimento são ancorar as fibras colágenas do ligamento periodontal à superfície radicular e uma importante função reparativa e adaptativa, exercendo um papel crucial na manutenção da relação oclusal e proteção à integridade da superfície radicular (Bosshardt & Selvig, 1997).

Outro importante componente é o ligamento periodontal, por ser um tecido conjuntivo não mineralizado especializado, situado entre o cimento que cobre a raiz do dente e o osso alveolar. Constituído de células e matriz extracelular composta de fibras colágenas e substância fundamental, além de vasos e nervos. As células incluem osteoblastos e osteoclastos (no interior do ligamento periodontal, mas funcionalmente associadas ao osso), fibroblastos, células dos restos epiteliais de Malassez, macrófagos, células mesenquimais indiferenciadas e cementoblastos (no interior do ligamento, mas funcionalmente associados ao cimento). Os componentes da matriz extracelular consistem em feixes de fibras colágenas, incluídos em um material amorfo, denominada substância fundamental, consistindo em glicosaminoglicanas, glicoproteínas e glicolipídios. (Ten Cate, 2001; Nanci, 2008).

Os fibroblastos são células importantes responsáveis pela renovação dos componentes da matriz extracelular, especialmente o colágeno. Eles ativados e em resposta a estímulos inflamatórios ou mecânicos, secretam diversos fatores de crescimento, citocinas e mediadores da inflamação. Entre eles a interleucina-1, interleucina-6 e interleucina-8, fator de necrose tumoral α, prostaglandina E2, entre outros (Ten Cate, 2001; Nanci, 2008).

O ligamento tem como principal função a de suportar o dente no seu alvéolo, permitir que ele resista às forças da mastigação e atuar como um

receptor sensorial para o posicionamento adequado dos ossos gnáticos (Ten Cate, 2001; Nanci, 2008).

2.2. Doença Periodontal

Sabe-se que a placa bacteriana, é o fator etiológico primário da doença periodontal (Kina et al., 2008). Esta é o resultado da petrificação do biofilme da placa dental, o que resulta na formação do cálculo, composto por íons minerais de fosfato de cálcio, provindos da saliva e dos fluidos creviciares, depositados entre e dentro dos remanescentes de microorganismos, subdividindo-se em supra-gengival e subgengival. Uma vez mineralizado, o cálculo se adere ao cemento e a superfície dentinária (White, 1997).

A manifestação clínica da doença periodontal, na maioria das vezes esta relacionada com um aumento considerável de bactérias gram-negativas, as quais são constituídas por endotoxinas, denominadas LPS. Estas possuem propriedades patogênicas, isto é atuam como um agente inflamatório na cavidade bucal, na composição da placa bacteriana, na saliva, no exsudato gengival e no tecido epitelial gengival (Aleo et al., 1974).

Bactérias gram-negativas isoladas incluem: *Porphyromonas gingivalis*, *revotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides forsythus*, *Capnocytophaga spp* e *Veillonella parvela*. Entre elas *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum* constituem maioria dos patógenos em periodontite de adultos. Entre elas *Bacteroides forsythus*, está fortemente relacionada à doença periodontal destrutiva. (Dzink et al., 1988; Slots & Listgarten, 1988; Lotufo et al., 1994). E as *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* produzem colagenases, e várias proteases que degradam os tecidos periodontais, e inibem os fatores dos fibroblastos (Slots & Genco , 1984; Morioka et al., 1993).

Após uma avaliação quanto a penetração de bactérias odontopatogênicas , no cemento e na dentina radicular de vinte e um dentes periodontalmente doentes, Adriaens et al. (1988) sugeriram o uso de agentes

condicionadores e antimicrobianos na descontaminação radicular, uma vez que eles observaram que o tratamento periodontal convencional por meio da raspagem, não elimina as bactérias presentes no interior dos túbulos, e somando a isso, tanto os túbulos dentinários, quanto riscos e depressões na superfície geradas pela instrumentação, podem ainda agir como reservatórios para as bactérias periodontopatogênicas.

A American Academy of Periodontology (1988) estabelece o termo “doença periodontal” como referência generalista a um certo número de doenças, que incide sobre os tecidos de revestimento e sustentação dental, bem como sobre o próprio dente (Socransky, 1977). Em 1982, Fennyhough & Page, confirmam este estudo anterior, dizendo que a periodontite é caracterizada não só pela formação de bolsas periodontais, inflamação, destruição do osso alveolar e mas também pela perda de inserção fibrosa , onde tanto o ligamento periodontal quanto os fibroblastos encontram-se destruídos.

Como o procedimento de descontaminação apenas por meio de raspagem e alisamento radicular, não é capaz de restaurar as estruturas perdidas, diversos tipos de terapêuticas cirúrgicas foram desenvolvidas com o intuito de regenerar o periodonto acometido pela doença periodontal (Oda & Carvalho, 2004).

2.3. Terapia Regenerativa

A terapêutica periodontal tem como objetivos primários curar ou controlar a doença periodontal e prevenir sua recidiva. Ela também visa recuperar as estruturas periodontais destruídas pela doença, pois mesmo parcialmente destruídos, os tecidos do periodonto abrigam células com capacidade para regenerá-lo (Gestrelus et al., 1997). Imediatamente após esta terapêutica, desencadeia-se cascatas celulares altamente organizadas e reguladas por vários mediadores químicos, fatores de crescimento além de outros reguladores ambientais e locais da ferida que levam a um processo chamado de cicatrização (Fine, 1981). A cicatrização ocorre como resposta a

vários tipos de injúrias e objetiva o restabelecimento da estrutura e da função tecidual (Takata, 1994). Ela pode desenvolver-se a partir de dois processos: regeneração e reparo.

Regeneração refere-se à restauração completa dos tecidos danificados por proliferação e diferenciação dos elementos do parênquima original. Em que se designa que uma nova inserção (formação de novo cimento, novo osso alveolar e novo ligamento periodontal) foi interposta nos locais onde havia sido perdida. Já o reparo é uma regeneração incompleta, pois restabelece os tecidos perdidos por tecido conjuntivo não especializado que forma fibrose e eventualmente uma cicatriz. Os tecidos danificados são substituídos por tecidos cuja função não é, necessariamente, àquela do tecido original (Oda & Carvalho, 2004).

Fernyhough & Page (1983) diziam que o objetivo final da terapia periodontal, portanto, é regenerar a inserção fibrosa. Caso essa reinserção ocorra, fibroblastos devem ou inserir, ou se tornar intimamente apostos sobre a superfície radicular, crescendo e produzindo colágeno e outras substâncias do tecido conjuntivo, compreendendo o ligamento periodontal normal. Fica constatado que a reinserção fibrosa é biologicamente possível, e que as características da superfície são de grande importância em determinar se a reinserção ou a não reinserção irá ocorrer. A inserção das fibras das raízes dos dentes, são produzidas e mantidas pelos fibroblastos do ligamento periodontal. Mas, se reinserção ou não irá ocorrer, isto é dependente em parte, se fibroblastos gengivais, podem ser induzidos para inserir nas superfícies radiculares, e produzir organizadas fibras do tecido conjuntivo.

Polson & Proye (1983) avaliaram por meio de técnicas histológicas a diferenciação entre fibrina e colágeno durante o processo de cicatrização na interface da superfície radicular na reimplantação de dentes após 1, 3, 7 e 21 dias. Relatando que superfícies radiculares cirurgicamente desnudas, condicionadas previamente com ácido cítrico, apresentavam uma ligação da fibrina com as fibras colágenas expostas em superfícies radiculares, capazes

de prevenir a migração apical do epitélio juncional. Justificado pelo fato de que no período inicial de 1 a 3 dias as células inflamatórias eram removidas e uma rede de fibrina era inserida na superfície radicular, e após 7 a 21 dias a região era repopulada com células do tecido conjuntivo e fibras colágenas substituídas pela fibrina. Fato não ocorrido em superfícies não condicionadas, que apresentaram migração apical do epitélio juncional.

Em 1984, Gomes et al. falaram sobre uma das capacidades da tetraciclina e suas derivações (minociclina, doxiciclina), que correspondia a de inibir o hormônio da paratireóide. A especificidade deste efeito foi demonstrado ao se comparar com outros tipos de antibióticos que não fossem a tetraciclina. Resultado a tetraciclina inibiu a reabsorção óssea, e enzimas colagenolíticas , que promoveram a degradação do colágeno. Portanto inibiram o hormônio da paratireóide.

Segundo Gabler & Creamer (1991) as tetraciclinas tem ainda como uma de suas funções a supressão das funções dos neutrófilos humanos. Devido os tecidos do hospedeiro serem protegidos por neutrófilos por meio de dois mecanismos: 1º os grânulos dos neutrófilos associam-se a enzimas que se segregam em um estado inativo; 2º os tecidos são protegidos contra estas enzimas por um escudo inibidor potente. A partir disto, células de neutrófilos podem ignorar esses elementos de proteção, ativando enzimas e destruindo o escudo através da síntese de radicais de oxigênio. Portanto, as tetraciclinas podem suprir os neutrófilos mediada por danos nos tecidos por meio da inibição da migração e da desgranulação e, potencialmente, mais importante ainda, por síntese supressora de radicais de oxigênio.

Em 1995, Blomlöf & Lindskog avaliaram os possíveis efeitos necrosantes imediatos em tecidos periodontais após aplicação de agentes químicos com pH baixo e neutro. Ácido fosfórico e ácidos cítrico, por apresentarem baixo pH , apresentaram em 20 segundos, efeitos necrosantes, nos retalhos de mucosas e nos tecidos periodontais. Já o EDTA com um neutro ph, não conseguiu induzir qualquer necrose detectável durante os períodos

experimentais. Se estes efeitos necrosantes imediatos de agentes com valores de pH baixos também podem prejudicar a cicatrização periodontal na perspectiva a longo prazo, estudos controlados experimentais *in vivo*, bem como clinicamente, necessitam ser avaliados, fim de confirmar se realmente o pH neutro é preferível.

Blomlöf et al. (1996), discutiam que soluções aquosas de ácido cítrico com baixo pH tem sido usadas em terapias periodontais cirúrgicas, por dissolverem smear layer em curta exposição de tempo e pela remoção de minerais, associada a exposição de fibras colágenas, mas por outro lado tem se pensado nestes produtos por terem efeitos necrosantes ao redor dos tecidos periodontais. Por isso o objetivo neste estudo, foi de avaliar a eficácia da aplicação subgengival do gel de EDTA 24%. Superfícies apenas raspadas não revelaram nenhum túbulo dentinário ou fibra colágena, o oposto ocorreu com o grupo que recebeu condicionamento com EDTA, com superfícies intertubulares cobertas por densas redes de fibrina, estendendo dentro do túbulo dentinário. Em conclusão, superfícies com EDTA podem aumentar o efeito do debridamento radicular não cirúrgico.

Em 1997, Işık et al. descreveram sobre a aplicação tópica de ácido em superfícies de dentina capaz de produzir uma zona de desmineralização, expondo fibrilas de colágeno de dentina e abrindo túbulos dentinários. Neste estudo, os efeitos *in vitro* de diferentes técnicas de aplicação de tetraciclina HCL foram investigados. De acordo com os resultados do MEV, pode ser desejável aplicar a tetraciclina HCL utilizando a técnica de polimento para expor fibrilas intertubular e para as aberturas tubulares. No entanto, esta técnica deve ser estudada, quando colocado em um sistema *in vivo*.

Ainda em 1998, Bergenholz & Babay tiveram como proposta de estudo comparar a textura radicular sujeita a uma gama de durações e modos de aplicação seguidos de agentes condicionantes por meio de soluções de ácido cítrico, tetraciclina hidroclorídrica , EDTA 8 % e solução salina, pós raspagem e alisamento radicular. Avaliadas nos tempos de 10, 30/40 e 180 segundos, com

espécimes brunidas ou imersas, em relação ao cimento, a smear layer, as rachaduras e a exposição dos túbulos dentinários. Os resultados sugerirão que o modo de aplicação e os agentes usados para condicionamento de superfícies, afetam as superfícies em diferentes caminhos, e podem ser importantes na regeneração do tecido periodontal. Uma superfície pode ser brunida com solução salina, ou com qualquer um dos agentes, com pelo menos 10 segundos, ou imersa em EDTA 8%, gerando uma superfície quimiotática para os fibroblastos, portanto, aumentando a possibilidade de regeneração periodontal.

Baker et al. (2000) tinham como objetivo de estudo o desenvolvimento de um modelo de blindagem para avaliação imediata na influência de protocolos condicionantes radiculares na absorção e na adesão de sangue nas superfícies dentinárias. Métodos usados: as superfícies dentinárias humanas de pelo menos 5 blocos tratadas em 4 grupos: com PBS, com ácido cítrico, PBS seguida de sangue e ácido cítrico seguido de sangue, e lavadas antes de serem avaliadas pelo MEV. Teve como resultados que: tratadas com ácido cítrico e raspadas apresentaram uma fina rede de fibrina direcionada inserida sobre a superfície dentinária entreposta por elementos celulares, principalmente eritrócitos. Ao passo que, superfícies dentinárias não tratadas, e raspadas, exibiram uma aparência amorfia, com fios esparsos da absorção de proteínas fibrosas e poucos eritrócitos aderidos. Concluindo que este modelo de blindagem foi efetivo, a medida que distinguiu as superfícies dentinárias, em relação ao potencial para aumentar a absorção e a adesão dos elementos sanguíneos.

Caffesse et al. (2000) ao avaliarem clinicamente os resultados obtidos com a realização de enxerto de tecido conjuntivo com e sem desmineralização com ácido cítrico usados no tratamento de recessões gengivais localizadas, demonstrou que ambas as técnicas cirúrgicas com e sem ácido cítrico ,reduziram a recessão gengival após 6 meses significativamente e que não houve diferenças entre os resultados encontrados. Portanto ambos reduziram a largura das exposições radiculares e obtiveram um bom recobrimento radicular,

com mínimas e insignificantes reduções da profundidade de sondagem e com aumento da quantidade de tecido queratinizado. Sendo assim o enxerto de tecido conjuntivo subepitelial providenciou uma solução satisfatória no tratamento de recessões gengivais localizadas e a desmineralização com ácido cítrico não afetou o resultado clínico da técnica cirúrgica.

Isik et al. (2000) ao avaliarem e compararem por meio do mev a morfologia da dentina radicular de dentes humanos, seguida de várias concentrações e tempos de aplicação de tetraciclina-HCL e também a média do diâmetro dos túbulos dentinários . Relataram que tetraciclina-HCL entre concentrações de 50 e 150 mg/mL demonstraram uma diferença estatisticamente significante em relação a abertura dos túbulos dentinários, e que todos os grupos de tetraciclina-HCL em 1,3 e 5 minutos mostraram remoção de smear layer vindo da superfície dentinária. Portanto, a desmineralização da dentina não foi dependente do tempo, e sim das concentrações de tetraciclina-HCL.

Zaman et al. (2000) tinham como objetivo avaliar quantitativamente a migração, inserção e orientação das células do ligamento periodontal humano (HPLC) do cemento em relação a dentina quando da instalação de doença periodontal , após a desmineralização com ácido cítrico, EDTA 24% ou tetraciclina- HCL 100 mg/ml. Os resultados indicaram não haver diferença estatisticamente significante no índice de inserção e orientação do HPLC do cemento comparado a dentina em nenhum método de desmineralização. Porém a desmineralização com EDTA 24% e ácido cítrico aumentou a inserção de HPLC na superfície radicular comparado a superfícies apenas raspadas, providenciando uma superfície mais biocompatível para retenção de substâncias biologicamente ativas, tal como fatores de crescimento, incluindo proteínas ósseas morfogenéticas, proteínas de matriz do esmalte, fatores necessários para formar a inserção de um novo tecido conjuntivo, causando a ocorrência previsível da regeneração periodontal.

Kassab & Cohen (2003) ao relatarem sobre a biomodificação da superfície radicular, diziam ser este um importante princípio para o tratamento de periodontite e das recessões gengivais, com justificativa que este procedimento leva a remoção de smear layer e exposição das fibras colágenas. Além disso, relatam que embora estudos em animais tem trago resultados promissores, estudos em humanos precisam ser realizados, a fim de discutir se o baixo pH de agentes biomodificadores pode assumir um efeito necrosante e se o mesmo não ocorria com agentes que possuíam um neutro pH. Concluem dizendo da necessidade de investigações clínicas, em avaliar parâmetros clínicos quando do uso desses agentes.

Mariotti (2003) em uma revisão de literatura avaliou a eficácia da biomodificação da superfície radicular por meio do uso de ácido cítrico aplicado por 1 a 5 minutos, durante um estudo entre 2 a 13 meses, EDTA 24%, aplicado por 2 a 3 minutos, com duração de 6 meses, e tetraciclina frequentemente aplicada na concentração de 100 mg/ml, por 3 a 5 minutos, e média de duração de 3 a 12 meses em pacientes com periodontite crônica. Foram avaliados os seguintes resultados; primários: inserção tecido conjuntivo, cementogênese, nível de inserção clínica, profundidade de sondagem e recessão gengival, e secundários: nível ósseo, inflamação gengival, e nível de placa. Mostrando que o uso desses agentes não beneficia a significância clínica de regeneração em pacientes com periodontite crônica. Relatando da necessidade de melhores resultados por meio de ensaios clínicos aleatórios, fortes análises estatísticas, suportadas pela avaliação histológica quantitativa.

Baker et al. (2005) realizaram um estudo *in vitro*, com o objetivo de avaliar a adesão do coágulo em proteínas condicionadas em superfícies dentinárias, pelo fato destas proteínas construtoras terem sido introduzidas recentemente, por condicionar a raiz durante a cirurgia periodontal. Como metodologia, utilizou blocos dentinários humanos nas medidas de 4x 6x 1 mm, que foram após condicionadas com ácido cítrico, EDTA, e alguns com proteínas: soro fetal bovino ou proteína derivada da matriz do esmalte. Sangue humano fresco foi aplicado sobre os blocos, até permitir a formação de coágulo. Após

analisados ao MEV. Chegaram a conclusão que as superfícies desmineralizadas com ácido cítrico, removeram a smear layer dentinária, por promover a adesão do coágulo de fibrina. O EDTA apareceu menos eficaz deixando resíduos de smear layer. Enquanto que as superfícies condicionadas com proteínas construtoras (soro fetal bovino ou proteína da matriz do esmalte) produziram uma superfície morfologicamente similar a camada de smear layer, com pobre retenção do coágulo de fibrina. Segundo eles, a melhor superfície para retenção do coágulo foi condicionada pelo ácido cítrico. Os espécimes tratados com EDTA apresentaram menor quantidade de coágulo, o qual se soltava facilmente da superfície. Já as superfícies tratadas com proteínas não foram capazes de reter o coágulo. Portanto disseram que o uso de uma substância que remova smear layer e exponha fibras colágenas é melhor por promover melhor sustentação do coágulo.

Chandra et al. (2005), tinham como objetivo de estudo avaliar *in vitro* a eficácia do método de azul de tripâo na fixação dos fibroblastos V79 (fibroblastos de pulmão embrionário de hamster chinês) e células do ligamento periodontal que atuavam como um controle, em amostras tratadas com ácido cítrico, EDTA, e tetraciclina. As amostras foram tratadas com condicionamento radicular, e após 4 semanas, foram removidas das culturas e imediatamente tratadas com 1% de azul de tripâo. Resultando que amostras colocadas em V79 e culturas humanas do ligamento periodontal mostraram áreas não coradas, indicando a presença de células vivas. Concluindo : Este modelo de rastreio *in vitro*, com base no princípio de exclusão de azul de tripâo pode ser usado para a avaliação imediata da eficácia de vários agentes de condicionamento radicular. Células V79 podem ser usadas como alternativas à ligamentos periodontais de fibroblastos na avaliação da eficácia de agentes condicionantes radiculares.

Tendo em vista que a adesão de elementos sanguíneos a superfícies radiculares desmineralizadas e a estabilização do colágeno pelas fibras colágenas são de grande importância no sucesso da cirurgia periodontal, Leite et al. (2005) conduziram este estudo ao avaliar diferentes padrões de adsorção

e adesão de elementos sanguíneos a superfícies radiculares em 30 amostras igualmente raspadas, e após divididas em três grupos com 10 amostras cada, apenas irrigadas com água destilada (controle), aplicadas com gel de EDTA e com EDTA industrializado. Os resultados mostraram que as superfícies apenas raspadas, tiveram os melhores resultados e moderada quantidade de células sanguíneas entremeadas em uma fina rede de fibrina. O grupo de EDTA manipulado, apresentou uma rede de fibrina pouco visível com escassas células. Já o EDTA industrializado, obteve os piores resultados, com ausência de elementos sanguíneos.

Parashis et al. (2006) ao compararem os resultados após 12 meses da aplicação da matriz derivada do esmalte, condicionadas com e sem EDTA gel 24% em procedimentos de terapias cirúrgicas de defeitos infra-ósseos. Apresentou os resultados que não teve diferença significativa nos grupos, ambos tiveram redução da profundidade de sondagem, ganho do nível clínico de inserção, e diminuição da recessão por durante 1 ano e melhorias radiográficas de mais de 60% dos defeitos infra-ósseos. Portanto os resultados clínicos e radiográficos de defeitos infra-ósseos com terapia de matriz derivada do esmalte, não depende do uso do ácido EDTA gel como condicionante radicular e seu potencial de contribuição deve também ser analisado histologicamente.

Silvério et al. (2007) ao avaliarem *in vitro* o efeito da superfície radicular condicionada com um fator de crescimento básico de fibroblasto (b-FGF) quanto a morfologia e a proliferação destes fibroblastos, em três grupos experimentais, não tratados e tratados com 50 e 125 µg de b-FGF, com amostras de dentina subdivididas em subgrupos de acordo com o tratamento químico :nenhum ou condicionamento com tetraciclina-HCL 50 mg/mL ou EDTA 24% recebido antes da aplicação de (b-FGF). Relatou que um pré-condicionamento químico é necessário para o ataque de (b-FGF) já que os resultados demonstraram ser melhores em superfícies radiculares condicionadas previamente. Apesar de que o EDTA 24% se comportou com melhores resultados em termos de densidade e adesão das células dos

fibroblastos, comparados as superfícies não condicionadas ou condicionadas à tetraciclina-HCL. Células estas precursoras no período inicial da cicatrização e regeneração da ferida periodontal.

Ishi et al. (2008) fizeram um estudo *in vitro* com finalidade de avaliarem a remoção de smear layer e a exposição de fibras colágenas pelo condicionamento com tetraciclina hidroclorídrica (TTC) usando o MEV. Usaram como metodologia quatrocentos e cinquenta amostras divididas em 10 grupos: controle (solução salina) e nove diferentes concentrações TTC foram aplicadas em doses de 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, e 250 mg / ml. A aplicação TTC foi realizada em todos os grupos de três formas diferentes (passivo, escovagem, e polimento) e em três diferentes períodos de condicionamento (1, 2 e 3 minutos). Um examinador previamente treinado, calibrado e cego avaliou as fotomicrografias das amostras utilizando o índice de Sampaio (2005). A análise estatística foi realizada através do "teste de Kruskal-Wallis e Dunn. Os resultados foram que as concentrações de 50 mg/mL e 75 mg/ml aplicadas por brunidura foram as mais eficazes na remoção de smear layer e exposição de fibras colágenas. Ambos o modo passivo de aplicação ($p = 0,0001$) e o período de um minuto de aplicação ($p = 0,002$) foram os menos eficazes. Portanto, as concentrações de 50 mg / mL e 75 mg / ml aplicadas por brunidura durante 2 ou 3 minutos, foram as mais eficazes.

Lee et al. (2010) desenvolveram um estudo com objetivo de criar um agente condicionante radicular que pudesse desmineralizar e desintoxicar a superfície radicular. Pensando assim criou um gel experimental que tinha como componente base um adesivo polímero sódio carboximetilcelulose (CMC) 3%, além de EDTA e triton x-100. Esse gel provou por meio de estudos histoquímicos pelo microscópio eletrônico de varredura (MEV) e microscopia confocal, os melhores resultados quando comparados aos demais grupos: EDTA 24%, ácido cítrico 10%, clorexidina 0,5% e Triton X-100 1 %, removendo totalmente a smear layer e expondo colágeno tipo I. Com morfologia de um maior número de fibroblastos aderidos em monocamadas, assumindo uma forma achatada, e nos demais agentes as células eram pequenas, algumas

achatadas e assumiam uma forma mais cuboidal. Portanto o gel experimental é uma ferramenta importante para o condicionamento radicular de superfícies radiculares infectadas, podendo também ser aplicadas em superfícies doentias de implantes.

Em concordância com o estudo Fontanari & Sampaio (2010), ao avaliarem o condicionamento radicular com diferentes agentes (ácido cítrico 25% e 1%, EDTA 24%, cloridrato de tetraciclina 50mg/mL e solução salina) em espécimes de dentes com cálculo visível (expostos à placa bacteriana) e dentes inclusos (não expostos à placa bacteriana) mostrou uma tendência a dentes não expostos à placa bacteriana apresentarem maior facilidade de remoção de smear layer (desmineralização), quando comparados a dentes expostos à placa bacteriana.

Leite et al. (2010) ao compararem a adesão e a maturação dos componentes sanguíneos em superfícies radiculares pós condicionamento químico com: EDTA gel 24 %, ácido cítrico 25 % , tetraciclina-HCL 50 mg/mL e citrato de sódio 30 % ,e com adição de uma gota de sangue em cada amostra ,por meio do mev. O melhor resultado foi mostrado pelo ácido cítrico, com uma densa rede de fibrina aderida a elementos sanguíneos, capaz de estabilizar o coágulo sanguíneo, que atuou como uma ligação para o desenvolvimento das células do tecido conjuntivo, já o grupo controle foi caracterizado pela ausência de elementos sanguíneos em sua superfície. Enfim, a exposição da rede de colágeno pode levar a maior estabilização da rede de fibrina e das células sanguíneas condicionadas nas superfícies radiculares, fatores de ligação entre a superfície e o tecido conjuntivo.

Amaral et al. (2011) pensando na importância da escolha de um agente químico ideal, pela sua capacidade em remover smear layer e abrir os túbulos dentinários, realizaram um estudo comparativo entre quatro ácidos: ácido cítrico 50 %, tetraciclina-HCL 50 mg/mL, ácido fosfórico 37% e EDTA 24 %. Através de duas avaliações: em relação a média do número de túbulos expostos, o grupo dos desmineralizantes ácido cítrico e tetraciclina-HCL foram

os que apresentaram melhores resultados, em sequência o ácido fosfórico e por fim o EDTA, com grande maioria das espécimes apresentando smear layer, e ausência de alguns túbulos expostos, e em relação, a média da área ocupada pelos túbulos alargados, não apresentando diferença estatisticamente significante do grupo controle em relação a tetraciclina-HCL. Mostrando a superioridade do ácido cítrico em relação aos demais.

Shetty et al. (2011) ao compararem as mudanças na superfície dentinária, seguida das aplicações de diferentes soluções de tetraciclina-HCL 250 mg, minociclina 100 mg, doxiciclina 100 mg e acido cítrico, pós superfícies radiculares instrumentadas, de dentes periodontalmente envolvidos, analisados ao MEV. Mostraram que todos os grupos foram efetivos em remover a smear layer, com exposição e abertura dos túbulos dentinários. Apesar de que a tetraciclina-HCL foi a que apresentou melhores resultados, em sequência o acido cítrico, e a minociclina e a doxiciclina, que não apresentaram diferenças estatisticamente significante entre ambas.

Martins et al. (2011) avaliaram por meio do mev os efeitos da aplicação tópica do gel de EDTA 24% associada a uma superfície catiônica denominada cetavlon (cetyltrimetilamoniumbromide), que originou uma substância denominada EDTAC. Analisando cada amostra em relação a instrumentação mecânica apenas, ou combinada com instrumentos ultrassônicos, associada ou não ao EDTAC gel 24 %.O autor chegou ao consenso que a associação da terapia mecânica a terapia química obteve melhores resultados a medida que mostrou abertura dos túbulos dentinários com identificação da dentina tubular e intertubular e exposição da fibra colágena . Portanto mostrando a eficácia do EDTAC.

Amireddy et al. (2011) fizeram um estudo com objetivo de avaliar pelo MEV a formação de rede de fibrina em superfícies radiculares e formação do coágulo. As amostras foram divididas em oito grupos, metade a dentes extraídos por motivos ortodônticos e o restante por motivos de doença periodontal, submetidas aos seguintes protocolos: condicionadas com pbs,

ácido cítrico (35.25 mg), pbs e sangue e ácido cítrico (35.25 mg), e sangue. Observaram que procedimentos como condicionamento radicular, garantem a previsibilidade e a viabilidade dos procedimentos regenerativos periodontais, já que o uso de ácido cítrico como agente condicionante tem um efeito benéfico nos eventos iniciais de cicatrização, fatores que são críticos em terapias regenerativas periodontais.

Fontanari et al. (2011) fizeram um estudo *in vitro* a fim de avaliar quatro tipos de agentes: EDTA 24 %, ácido cítrico 1 % e 25 %, e tetraciclina hidroclorídrica 50 mg/ mL , quanto ao grau de hipermineralização em relação a desmineralização dos agentes químicos aplicados sobre a superfície radicular. O estudo foi comparativo entre dentes impactados (não expostos a cavidade oral) e dentes expostos a cavidade oral. Em relação aos dentes expostos a cavidade oral, o EDTA 24 % e ácido cítrico 25 %, tiveram melhor poder de desmineralização, justificado pelo poder de mineralização da superfície dentinária e uma excelente capacidade de remoção da smear layer, já em dentes impactados a tetraciclina 50 mg/mL e o ácido cítrico 1 % , tiveram melhor capacidade de remoção do smear layer devido o baixo grau de mineralização da superfície dental, por apresentarem maior desmineralização do que hipermineralização. O autor conclui que o grau de mineralização radicular pode influenciar a desmineralização química.

Cavassim et al. (2012) fizeram um estudo com o objetivo de estabelecer os parâmetros de concentração, tempo e modo de aplicação do ácido cítrico e do citrato de sódio em relação ao condicionamento radicular. O estudo contou com um total de 495 amostras de 124 dentes cometidos periodontalmente igualmente distribuídas em 11 grupos: 5 para diferentes concentrações testadas de ácido cítrico, 5 para diferentes concentrações testadas de citrato de sódio e um grupo controle. O ácido cítrico foi avaliado nas concentrações de 0, 5, 1, 2, 15 e 25 %, durante 1, 2 e 3 minutos, nas formas de aplicação passiva, brunida e brunida. E o citrato de sódio, testado nas concentrações de 3, 10, 20, 30 e 40 %, durante 1, 2 e 3 minutos, nas formas de aplicação passiva, brunida e brunida . Após procedimento laboratorial, foram analisadas

ao MEV. Resultando que amostras brunidas com ácido cítrico a 25% durante 3 minutos, promoveram melhor exposição de fibras colágenas em comparação com o ácido cítrico brunido a 1 % durante 1 minuto e também em relação a sua aplicação tópica a 1 % durante 3 minutos. Já o citrato de sódio expos apenas pequenas fibras colágenas, portanto não indicado como condicionante radicular.

Minocha & Rahul (2012), em um estudo *in vitro*, buscaram avaliar e comparar superfícies radiculares após aplicação de solução de ácido cítrico, EDTA gel 24 %, solução de tetraciclina, e solução de tetraciclina associada ao ácido cítrico, na influência na adesão de coágulo de fibrina. Foram avaliadas 100 amostras, divididas em 5 grupos, entre eles o grupo controle (solução salina), subdivididas em 20 amostras por grupo, com 10 amostras que receberam PBS e denominadas como não-agitadas, e a outra metade lavadas com PBS e colocadas em uma máquina giratória, por isso denominadas, agitadas. Amostras foram levadas ao MEV, para análise de imagens. O grupo controle obteve a menor pontuação, como esperado pelos autores, e a mais alta pontuação de adesão do coágulo sanguíneo, pertenceu ao grupo aplicado pela solução de combinação de ácido cítrico e tetraciclina, tanto como o grupo aplicado com solução de ácido cítrico sozinha, por terem melhor suportado o coágulo de fibrina. Solução de tetraciclina, apareceu por ser a menos efetiva e o EDTA gel 24 % foi o menos efetivo, só cedendo lugar ao grupo controle, que apresentou os piores resultados. Além disso a adesão do coágulo de fibrina, não pode ser interrompido pela força produzida pela máquina giratória em todos os grupos, exceto no grupo do EDTA gel 24%, porém foi o menos efetivo.

Srirangarajan et al. (2012) ao avaliarem a eficácia do EDTA-S, isto é a aplicação de um detergente adicionado ao EDTA 15%, observou que este novo agente condicionante providenciou melhores resultados comparado ao EDTA 15 % sozinho, ou comparado ao grupo controle (solução salina), que obteve os piores resultados, no que condiz à remoção de smear layer. E a aplicação ativa deste mesmo agente condicionante radicular, teve uma diferença significativa, e portanto foi melhor, em relação à aplicação passiva.

2.4. Dentina

A dentina é um tecido conjuntivo avascular, mineralizado, especializado que forma o corpo do dente, suportando e compensando a fragilidade do esmalte, que a recobre em sua porção coronária e composta pelo cemento na porção radicular. Sua superfície interna delimita a cavidade pulpar onde se aloja a polpa dentária. Por ser um tecido vivo, contém prolongamentos de células especializadas e substância intercelular. Dentina e polpa formam um complexo em íntima relação topográfica, embriológica e funcional, por isso têm características biológicas comuns (Ten Cate, 2001 & Nanci, 2008).

Entre suas propriedades físicas temos que ela é um tecido muito duro, mais que o osso e o cimento, apresenta considerável elasticidade, devido ao arranjo em rede das suas fibras colágenas, cedendo mediante pressões, e com isso, amortece as forças mastigatórias impostas sobre o esmalte, impedindo que o mesmo se frature e tem característica canalicular, e, portanto permeável; substâncias podem penetrar através dos canalículos e atingir a polpa.

Primeiramente ocorre a deposição de uma matriz não mineralizada chamada pré-dentina que reveste à porção pulpar e gradualmente se mineraliza em dentina, composta por aproximadamente 70% de material inorgânico, 20% de material orgânico e 10% de água e 45%, 33% e 22%, respectivamente por volume. Seu componente inorgânico consiste, principalmente, de cristais de hidroxiapatita, e a fase orgânica, principalmente fibrosa, é constituída de proteína colágena. Além disso, a dentina caracteriza-se pela presença de múltiplos túbulos dentinários, dispostos muito próximos e que se estendem por toda a espessura da dentina, da junção amelodentinária até a polpa e que contém extensões citoplasmáticas dos odontoblastos, as células que a formam, tornando a dentina um tecido sensível, capaz de fazer reparos, devido aos odontoblastos, que podem estimular o depósito de mais dentina, conforme haja necessidade (Ten Cate, 2001; Nanci, 2008).

A dentina radicular tem a mesma estrutura da dentina coronária. As linhas incrementares acham-se dispostas no sentido longitudinal em relação ao longo eixo do dente, demonstrando a deposição da dentina. Seus canalículos se apresentam menores, com ramificações e trajeto sinuoso discretos. Isto se deve ao fato de que os odontoblastos desta região, que são praticamente cubóides, apresentam menor atividade metabólica, elaborando dentina muito lentamente. Toda dentina radicular é envolvida externamente pelo cimento, que é uma estrutura pertencente ao periodonto de sustentação. A dentina se relaciona com o cimento por meio da zona granular de Tomes. Percorrendo os canalículos da porção radicular em direção ao cimento, se comprova que a imensa maioria deles desaparece ao chegar nesta. Por este motivo se acredita que a zona granular de Tomes é a terminação natural da maior parte dos canalículos radiculares (Nanci, 2008).

Uma vez que ocorre o processo de cementogênese, e a dentina encontra-se descontaminada, um novo cimento e uma nova dentina, altamente saudáveis, receberão cascatas celulares altamente organizadas e reguladas por vários mediadores químicos, fatores de crescimento além de outros reguladores ambientais e locais da ferida (Fine, 1981) e o processo regenerativo irá ocorrer.

Proposição

3. PROPOSIÇÃO

Este estudo *in vitro* tem por finalidade avaliar, a superfície radicular submetida à raspagem associada ou não ao condicionamento químico, quanto:

- presença de smear layer e de resíduos dos produtos
- adesão de componentes sanguíneos
- adesão de fibroblastos à superfície radicular
- metabolismo celular pelo ensaio do método colorimétrico MTT-Formazan

Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Seleção dos dentes

Após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (Protocolo # 041/11) e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexos) foram selecionados 96 dentes incisivos inferiores humanos, extraídos devido doença periodontal severa, de pacientes em atendimento na Clínica de Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia. Para inclusão neste estudo, o dente deveria apresentar envolvimento periodontal severo (perda de inserção de mais da metade do segmento radicular) e superfície entre a junção cemento-esmalte e ápice radicular íntegra em relação à cárie, abrasão e restaurações.

4.2. Preparo dos dentes e obtenção dos blocos de dentina

Após a extração, os dentes foram lavados em água destilada para remoção de restos de tecidos moles e sangue, em seguida armazenados em solução salina tamponada com fosfato (PBS) (pH 7.4) a 37° C para evitar a desidratação dos mesmos.

Utilizando disco diamantado dupla face (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) sob irrigação abundante, duas canaletas paralelas foram confeccionadas tanto na face vestibular radicular como na face palatina ou lingual, uma na junção cemento-esmalte (JCE) e outra a 3 mm apicalmente à primeira canaleta (Figura 1). Dois blocos de dentina, aproximadamente 3x3X2 mm, foram obtidos de cada dente, um da face vestibular e outro da face lingual (totalizando 192 espécimes). Os fragmentos foram submetidos à limpeza em ultrassom e água destilada por 10 minutos com 2 repetições para remoção de resíduos superficiais. Os blocos de dentina obtidos foram armazenados em solução salina.

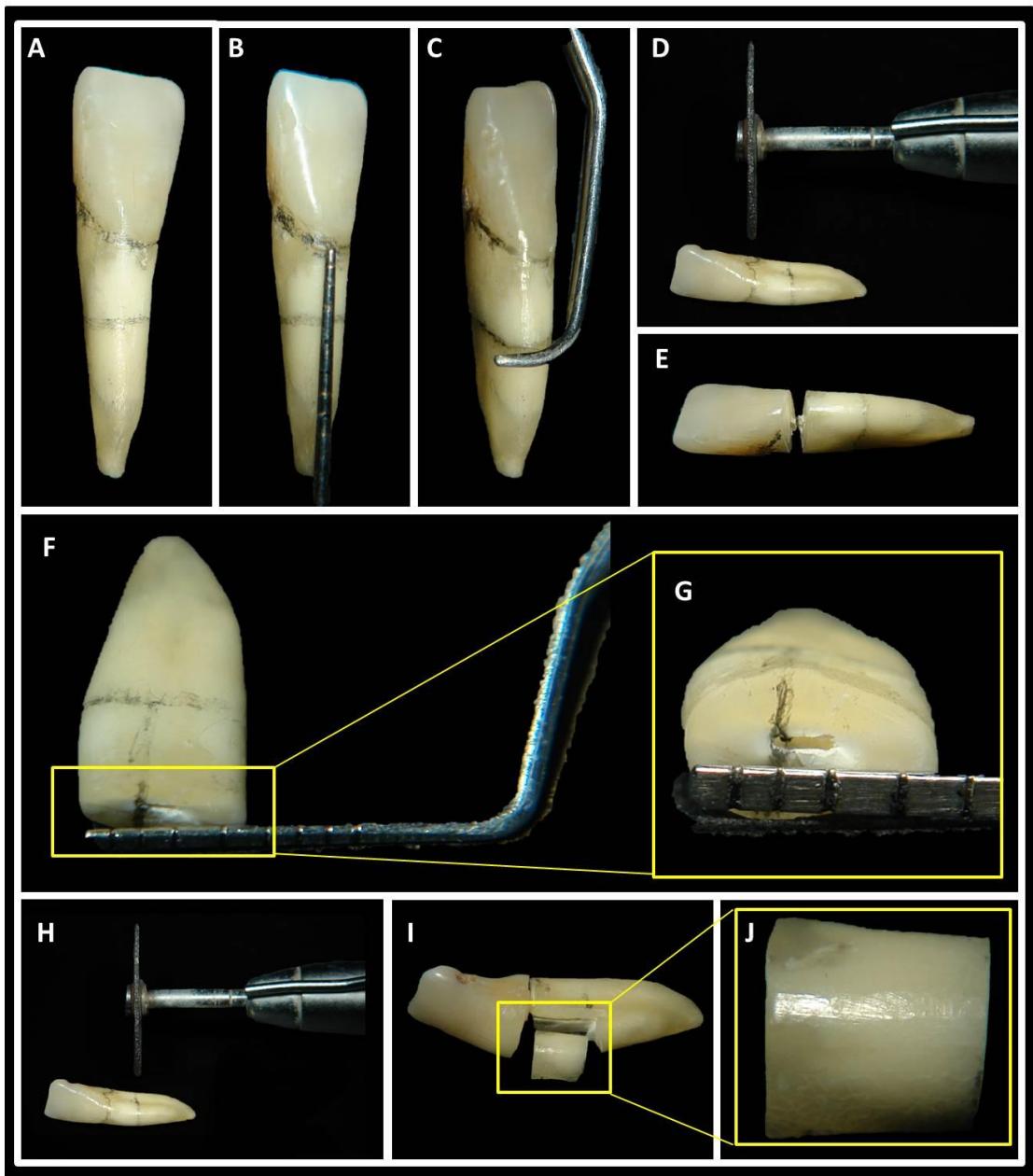


Figura 1. Sequência para obtenção dos blocos de dentina. A- Seleção dos dentes; B- Delimitação da superfície em 3 mm; C- Raspagem radicular (50 movimentos ápico-cervicais); D, E- Corte com disco diamantado na JCE; F, G- Marcação de 2 mm; H- Corte 3 mm da JCE; I, J- Fragmento dental.

4.3. Protocolo de tratamento radicular

As espécimes foram aleatoriamente distribuídas em 6 grupos (n=32), variando o tipo de tratamento químico da superfície radicular. Controle- grupo controle, não foi realizado nenhum tipo de tratamento na superfície. Nos demais grupos, foi realizada raspagem manual com cureta Gracey 5-6 (Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA) na área correspondente ao intervalo entre as duas canaletas, com 50 movimentos de tração no sentido ápico-cervical, sob irrigação de solução salina, pelo mesmo operador, para remoção de cálculo dental e cimento contaminado (Adriaens et al., 1988; Leite et al., 2005; Soares et al., 2010).

4.4. Tratamento químico das superfícies radiculares

As amostras foram distribuídas de acordo com o tipo de tratamento radicular proposto: (Soares et al., 2010)

RAR: raspagem e alisamento radicular com irrigação de 10 mL de soro fisiológico;

Ácido Cítrico: RAR e posterior aplicação de solução de ácido cítrico 30% (Figura 2A) pH 1.6 (Biopharma, Uberlândia, Brasil), aplicado por 5 minutos associado à lavagem por 1 minuto com 10mL de soro fisiológico;

EDTA: RAR e posterior condicionamento com gel de EDTA 24% (Figura 2B) pH 7 (Biopharma, Uberlândia, Brasil) por 1 minuto associado à lavagem por 1 minuto com 10mL de soro fisiológico;

Tetraciclina Gel: RAR e posterior aplicação de gel de tetraciclina 50mg/mL (Figura 2C) pH 1.8 (Biopharma, Uberlândia, Brasil) por 1 minuto associado a lavagem por 1 minuto com 10mL de soro fisiológico;

Tetraciclina cápsula: RAR e posterior aplicação de pasta de comprimido de tetraciclina 500 mg dissolvido em soro fisiológico (Figura 2D) aplicado por 3 minutos associado à lavagem por 1 minuto com 10mL de soro fisiológico;

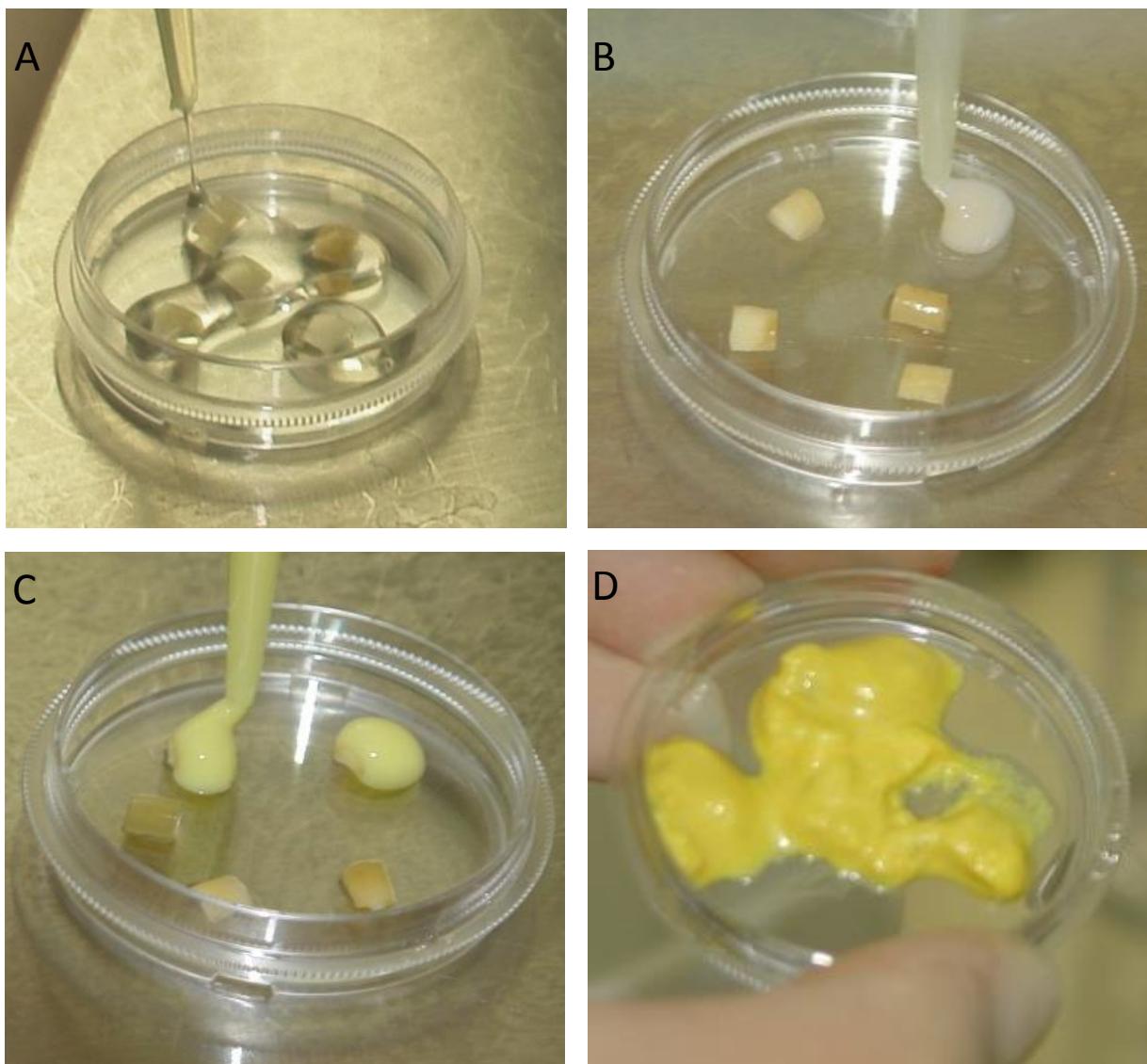


Figura 2. Agentes condicionantes. Blocos de dentina sendo condicionados quimicamente sobre a superfície radicular. A- Ácido cítrico, B- EDTA, C- Tetraciclina gel, D- Cápsula de tetraciclina.

As espécimes foram em seguida aleatoriamente utilizadas em 4 metodologias diferentes :

4.5. Presença de smear layer e resíduos dos produtos - Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Imediatamente depois de lavadas as espécimes de dentina ($n=9$) foram desidratadas em série crescente de soluções de etanol de 30%, 50% e 70%,

por 30 minutos, seguida pelas soluções de etanol 95% e 100 % por 60 minutos em dois tempos e imersas em 200 μ L de (1,1,1,3,3,3-hexametildissilazano (HMDS- Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EUA) por 60 minutos em temperatura ambiente. Após aplicação do HMDS, ficaram armazenadas em caixas plásticas, fechadas para evitar umidade das amostras para posterior avaliação em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

As amostras foram fixadas com tira de carbono sob os “stubs” metálicos, em seguida levadas ao dessecador por 24 horas, após receberam fina camada de ouro, com 15 nm de espessura. Após a metalização as amostras foram examinadas no MEV (EVO MA 10, CARL ZEIZ, Germany), a voltagem de 10 KV (Figura 3).

Para avaliar a presença de smear layer e resíduos dos produtos, as imagens microscópicas do centro de cada espécime foram obtidas em aumento de 1000X. As fotomicrografias foram analisadas por 1 examinador previamente calibrado, treinado e sem conhecimento quanto à identificação das amostras. Para cada fotomicrografia, o examinador realizou 3 leituras com intervalo mínimo 7 dias entre elas, e após a coleta de dados, cada amostra recebeu a pontuação que prevalecia entre as três leituras.

Para a análise, o examinador realizou a descrição morfológica da superfície previamente utilizada por Soares et al (2010).

Presença de smear layer:

1 – presença de grande quantidade de smear layer

2 – ausência de smear layer

Presença de resíduos do produto:

1- presença de grande quantidade de resíduos do produto

2- nenhum resíduo do produto deixado com o uso.

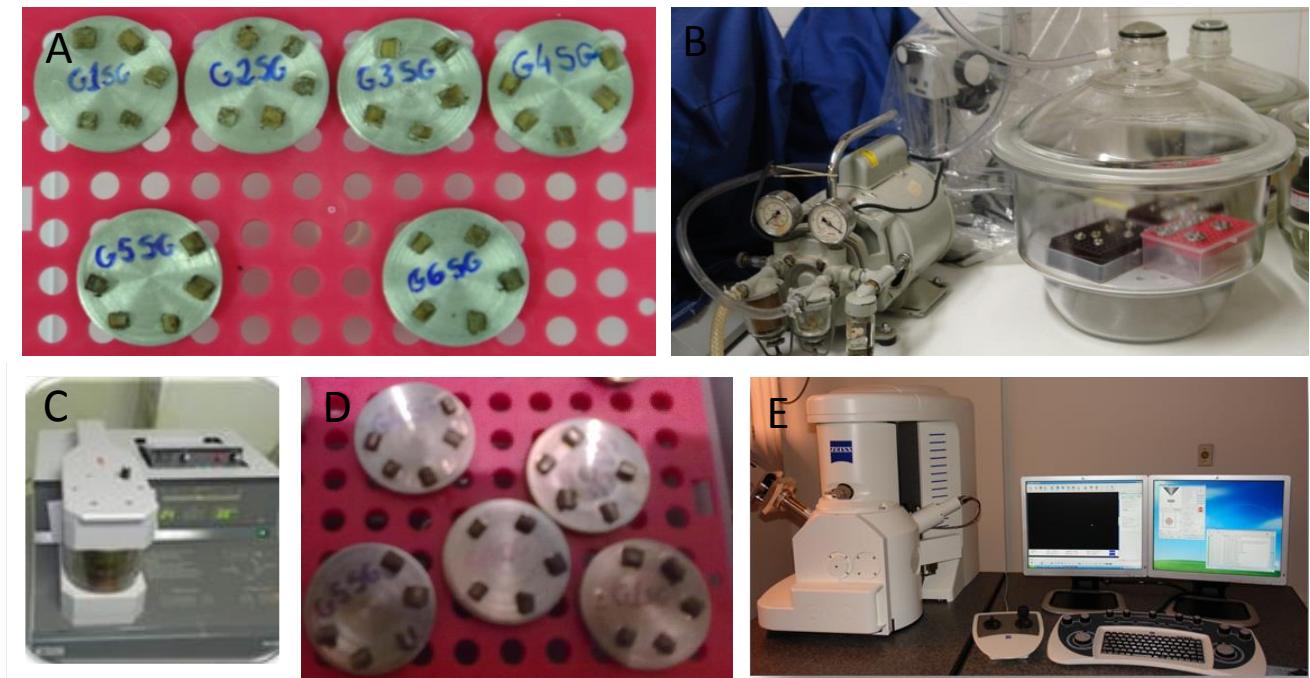


Figura 3. Seqüência dos procedimentos realizados para obtenção das imagens microscópicas. A– amostras montadas em “stubs” metálicos, B – amostras mantidas em dessecador por 24 horas, C - metalizador MED 10, D – amostras metalizadas, E - microscópio eletrônico de varredura.

4.6. Cultura de células

Fibroblastos humanos imortalizados da linhagem HFF (BCRJ- Banco de células, Rio de Janeiro, Brasil) foram descongelados e cultivados em garrafas de poliestireno de 25 cm² contendo meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Cutilab, Campinas, SP, Brasil), sulfato de gentamicina e anfitericina B, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco, Grand Island., NY, EUA) em estufa de CO₂ humidificada, em condições de 37°C, 5% CO₂, 95% ar (Smart cell, Heal Force). O meio foi trocado a cada 3 dias, até que as células atingissem confluência. Diariamente, as garrafas eram analisadas em microscópio invertido para análise do crescimento celular. Depois de atingirem 80% de confluência, as células foram liberadas utilizando tripsina-EDTA. As células, enzimaticamente isoladas, em suspensão, eram transferidas

para tubos contendo DMEM 10% com o dobro da quantidade de tripsina colocado, para neutralizar sua reação, e depois eram centrifugadas por 10 minutos a 12000 rpm, até ocorrer a formação do “pellet” ou botão celular, no qual as células se depositavam no fundo do tubo. O meio contendo o reagente era descartado e as células suspendidas em novo meio (Figura 4).

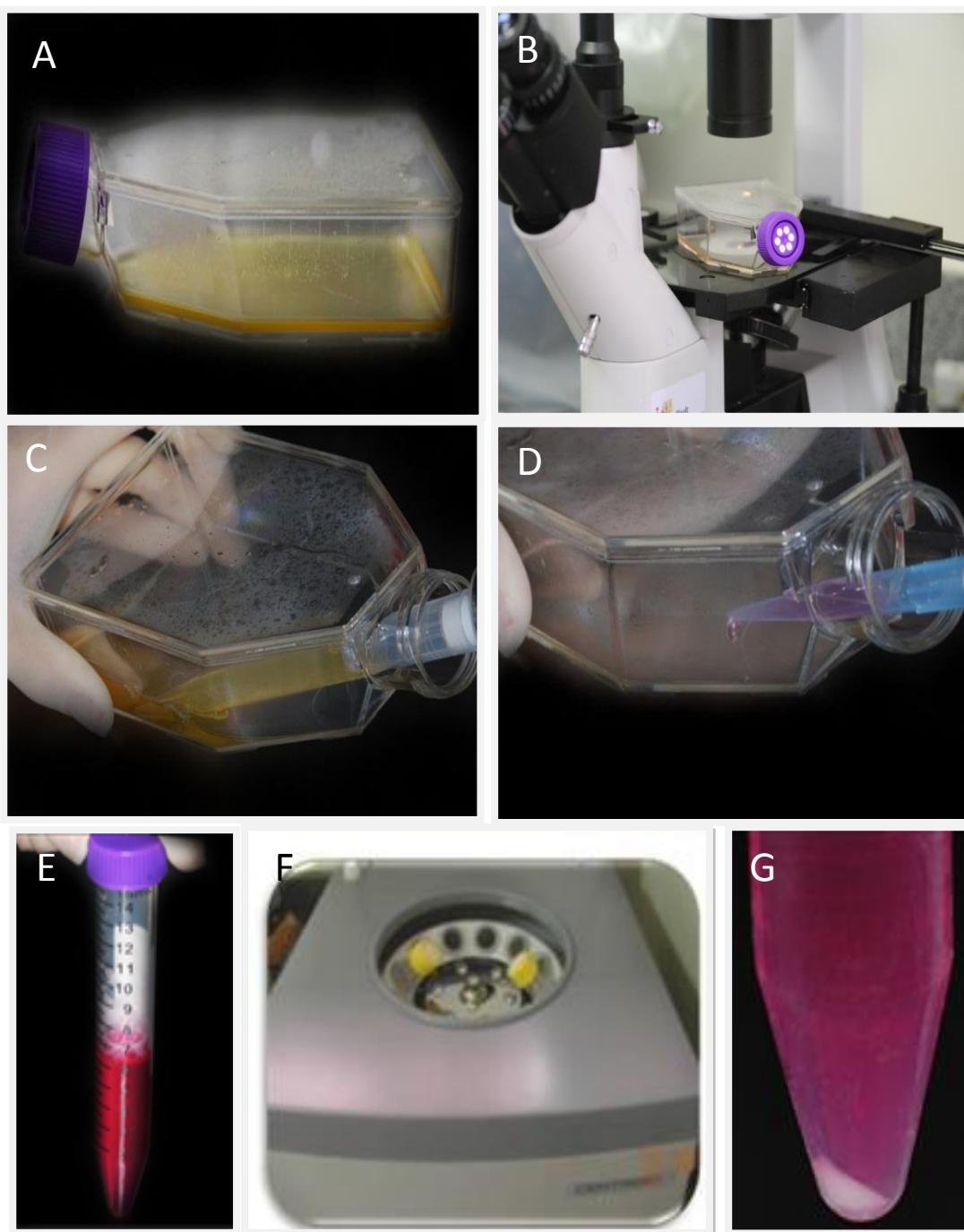


Figura 4. Processo de tripsinização. A - cultura de fibroblastos humanos, B - garrafas analisadas em microscópio invertido para análise do crescimento celular, C - adição da Tripsina-EDTA, D – adição de DMEM 10%, E – células em meio prévio à centrifugação, F – centrífuga, G - formação do “pellet” ou botão celular.

Após a tripsinização, as células foram plaqueadas sobre as amostras, após contagem em câmara de Neubauer (Figura 5), pela adição do azul de tripâo (SIGMA), para estabelecer o número de células a ser depositado em cima dos fragmentos de dentina submetidos a cada tratamento, que com a utilização de um microscópio, resultou num total de 1×10^5 células. (Figura 6).

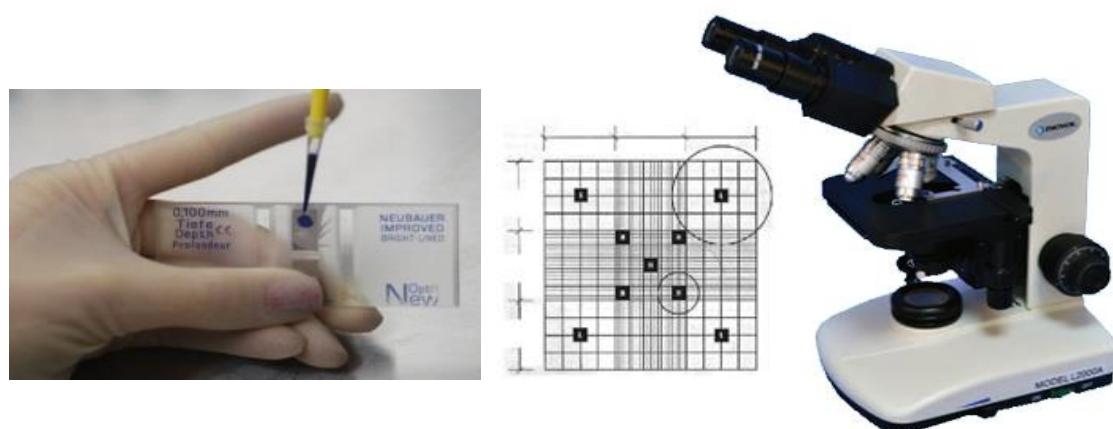


Figura 5. Contagem de células com o uso do reagente azul de tripan, mostrando a Câmara de Neubauer ou hemocitômetro.

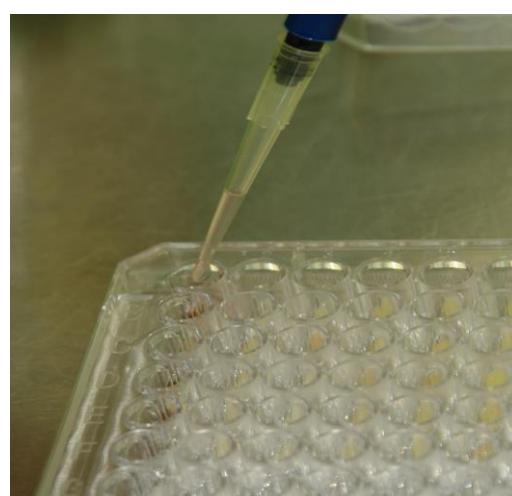


Figura 6. Plaqueamento de células (1×10^5 células/100 μL) sobre as amostras pós tratamento químico.

4.7. Determinação da viabilidade celular

Para a análise da viabilidade celular com período de avaliação de 4 horas, as espécimes ($n=5$) foram colocadas dentro de uma placa de 96 poços (Thermo Fisher Scientific.,Korea), 1×10^5 número de células/poço foram suspendidas em 50 μL de meio DMEM, e a suspensão foi plaqueada diretamente na superfície do bloco de dentina. Após uma hora do período de incubação, 50 μL do meio de cultura foi adicionado na suspensão e levado a estufa por 24 horas. O controle positivo correspondia às células mantidas ao meio DMEM 10% plaqueadas diretamente na placa. Após 4 horas, o meio foi removido e 100 μL de meio puro e 20 μL de solução de 3 - [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difenil tetrazólio Brometo (MTT) foi adicionado para cada poço afim de medir a atividade mitocondrial das células. O MTT corresponde a um método colorimétrico, no qual se baseia na atividade da enzima lactato desidrogenase, liberada pelo metabolismo das mitocôndrias. Após 4 horas, a solução de MTT foi removida, e 100 μL de DMSO (Dimetil sulfóxido) (Sigma-Aldrich) foi adicionado por cada poço, novamente, a placa retornou para estufa por cinco minutos, para aumentar a velocidade da reação e a solubilização dos cristais de formazan. Concluído este período, o sobrenadante foi removido e adicionado à nova placa, sem amostras no fundo, para determinar a viabilidade celular pela medida da absorbância em leitora de microplaca (Biochrom Asys UVM340) em comprimento de onda de 570nm (Figura 7).

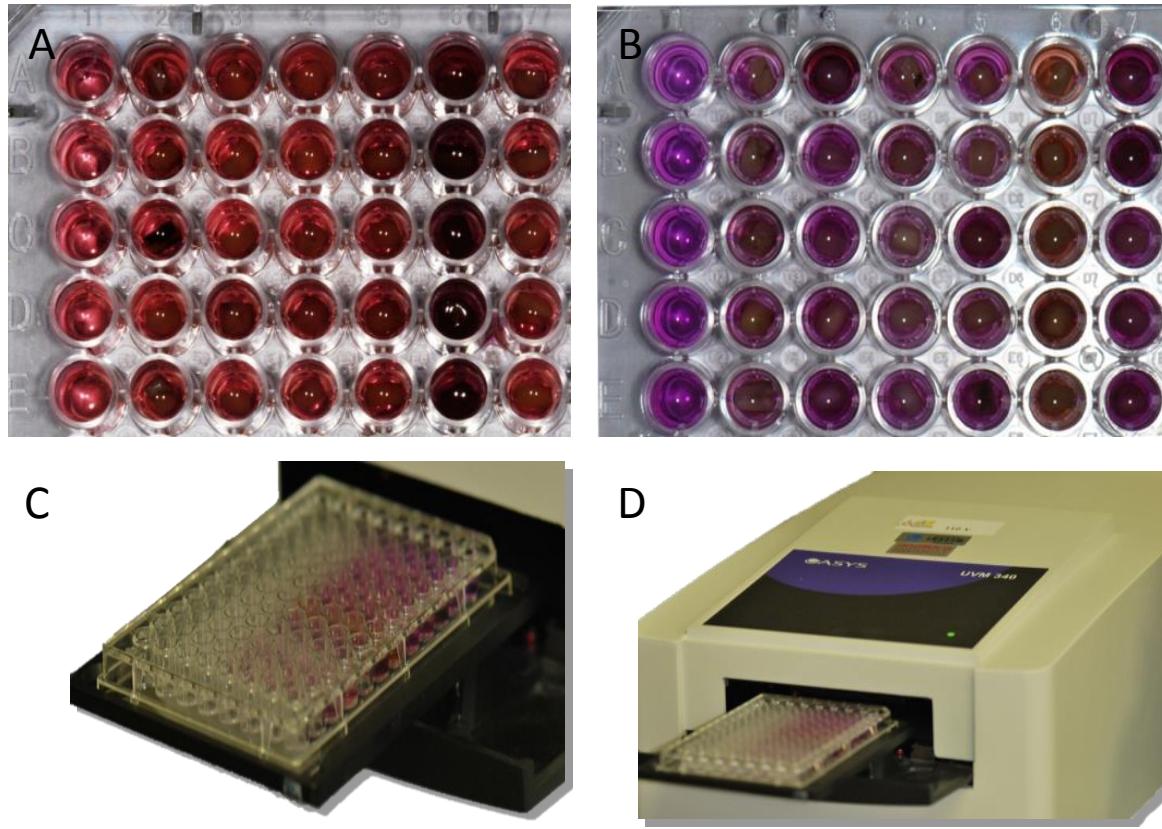


Figura 7. Método colorimétrico – MTT formazan. A – MTT adicionado em cada poço para mensurar a atividade mitocondrial, B – adição de DMSO para solubilização dos cristais de formazan, C – placa em posição para leitura, D - leitora de microplaca em comprimento de onda de 570nm.

4.8. Adesão celular de fibroblastos - Análise por MEV

A análise da adesão celular foi realizada usando o MEV ($n=9$). Brevemente, 1×10^5 número de células por poço foram colocadas a superfície de dentina tratada com sequência do método descrito na seção de citotoxicidade celular. Os blocos de dentina com células de fibroblastos aderidas na superfície dentinária foram imediatamente imersas em solução de glutaraldeído 2,5 % por 60 minutos (Figura 8). Após, amostras foram lavadas em PBS (1x) três vezes, durante 5 minutos cada, as amostras foram sujeitas a uma pós-fixação, com 1 % OsO₄ em 0,1 Molar PBS, por 60 minutos e após lavado duas vezes com PBS por 5 minutos cada e duas vezes em água destilada, por 15 minutos cada. A sequência de tratamento já foi descrito no

item 4.5. As células que permaneceram sobre a superfície dentinária foram observadas em MEV.

Para a análise das fotomicrografias, os fibroblastos aderidos foram contados por único examinador, com ajuda do software Image J. Dois campos de 1 mm^2 por espécime foram contados e a média do valor foi calculado por espécime. Destacando que foram realizadas 3 leituras com intervalo mínimo 7 dias entre elas.

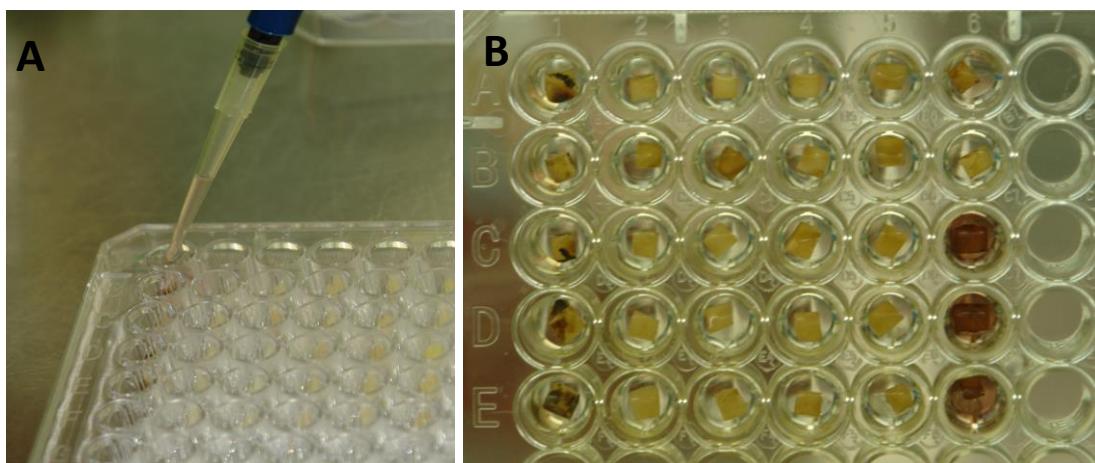


Figura 8. Adesão de fibroblastos. A – plaqueamento das células, B – amostras na placa de poliestireno.

4.9. Adesão dos componentes sanguíneos - Análise por MEV

Logo após o tratamento das espécimes ($n=9$), sangue fresco humano periférico de um doador saudável do sexo feminino foi imediatamente aplicado à superfície externa da raiz (Figura 9). O sangue foi deixado coagular sobre os blocos dentinários durante 20 minutos numa câmara humidificada a 37°C , até haver a formação de coágulo sanguíneo, e imediatamente foram fixados em glutaraldeído 2,5 % por 1 hora. A sequência de tratamento já foi descrito no item 4.5. Após aplicação do HMDS, ficaram armazenadas em caixas plásticas, fechadas para evitar umidade das amostras. Logo após, foram submetidas à avaliação em MEV. Para cada fotomicrografia, o examinador realizou 3 leituras

com aumento de 3.000 X com intervalo mínimo 7 dias entre elas, e após a coleta de dados, cada amostra recebeu a pontuação que prevalecia entre as três leituras. Para a análise das fotomicrografias das amostras que receberam o tecido sanguíneo, foi utilizado sistema de Classificação para adesão dos componentes sanguíneos, descrito previamente por Minocha & Rahul (2012):

- 0- ausência de rede de fibrina e de células sanguíneas;
- 1- escassa rede de fibrina e/ou de células sanguíneas;
- 2- moderada quantidade de células sanguíneas e moderada rede de fibrina;
- 3- densa rede de fibrina e células sanguíneas aprisionadas.

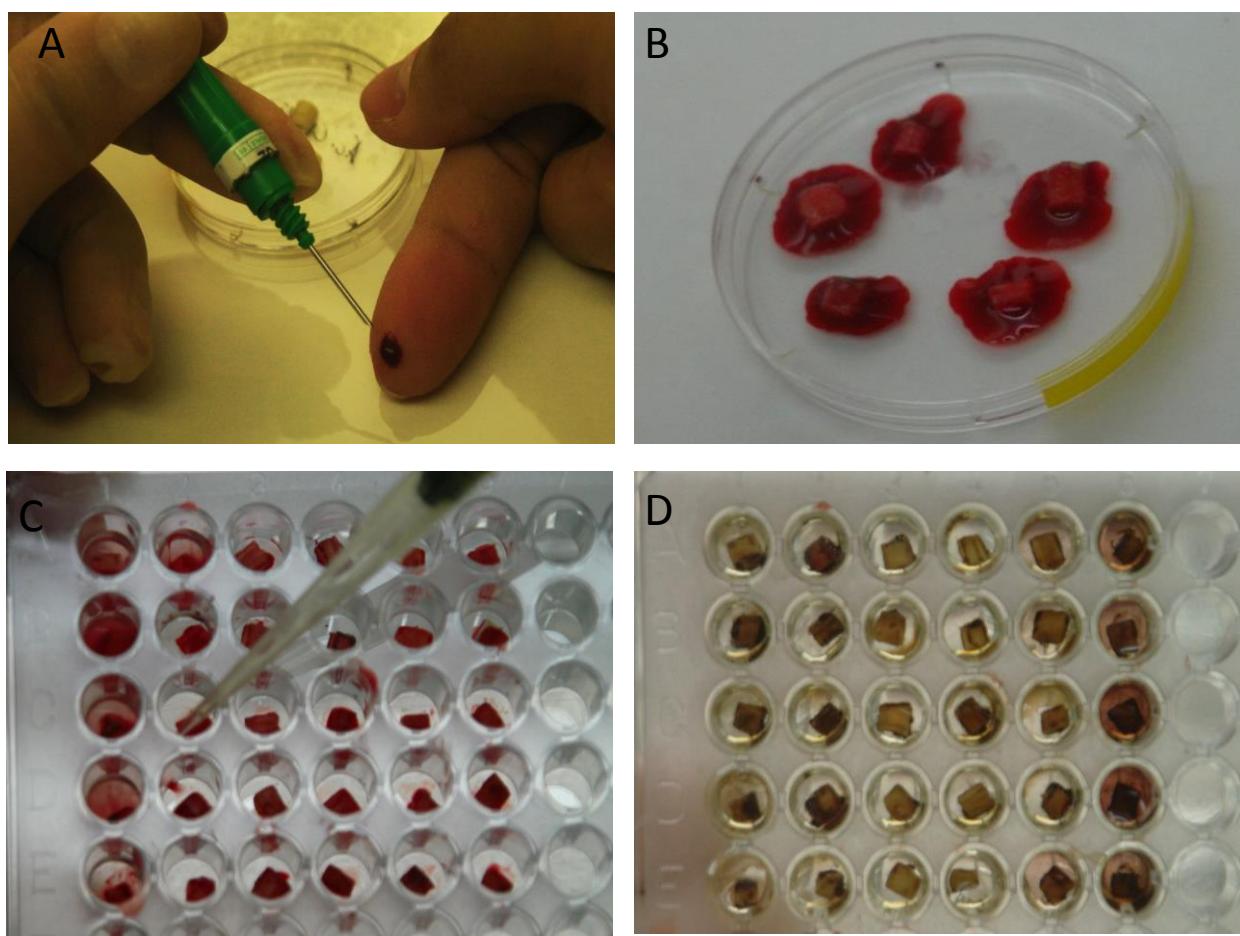


Figura 9. Adesão de células sanguíneas. A – sangue fresco humano periférico, B – sangue deixado coagular sobre os blocos dentinários, C – lavagem das amostras com PBS, D - fixação com glutaraldeído 2,5 %.

5.0. Análise estatística

Os valores obtidos foram submetidos ao teste de homogeneidade de variância, ANOVA. Por apresentarem normalidade, os dados estatísticos foram analisados pelo teste Dunnett ($\alpha = 0,05$) relacionando a significância entre o grupo controle e os demais grupos experimentais, e a significância por categoria estatística, relacionando os dados entre os grupos experimentais, calculada pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Resultados

5. Resultados

Presença de smear layer

As imagens ilustrativas da Figura 10 demonstram a superfície dos blocos de dentina tratados com cada agente de condicionamento radicular. A presença de smear layer na dentina (scores) para todos os grupos são mostrados na Tabela 1. Teste exato de Fisher revelou diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p<0,05$). Teste de Dunnett mostrou que os grupos Tetraciclina gel, EDTA e Ácido cítrico apresentaram níveis significativamente menores de smear layer comparados ao grupo de raspagem e alisamento radicular (Tabela 1).

Presença de resíduos do produto

A presença do produto na dentina (scores) para todos os grupos são mostrados na Tabela 2. Teste exato de Fisher revelou uma diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p<0,05$). Teste de Dunnett mostrou que os grupos Tetraciclina gel, EDTA e Ácido cítrico apresentaram níveis significativamente menores de resíduos dos produtos comparados ao grupo da Tetraciclina cápsula (Tabela 2).

Ensaio de MTT

Os valores do ensaio de MTT (média e desvio padrão) para todos os grupos experimentais e grupo controle estão apresentados nas Tabelas 3 e 4. ANOVA revelou diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p<0,05$). Teste de Dunnett mostrou que os grupos Tetraciclina cápsula, EDTA, Ácido cítrico e o grupo de raspagem e alisamento radicular resultaram em níveis significativamente menores de células viáveis em relação ao grupo de controle. Por outro lado, Tetraciclina gel resultou em nível semelhante de células viáveis comparada ao grupo controle (Tabela 3). Teste de Tukey mostrou que Tetraciclina gel resultou em significativamente maior viabilidade celular do que os outros grupos experimentais (Tabela 4).

Adesão de fibroblastos

Figura 11 ilustra a adesão de fibroblastos aos blocos de dentina humana. Os números médios de fibroblastos (média e desvio padrão) para todos os grupos experimentais e grupo controle estão apresentados na Tabela 5. ANOVA revelou uma diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p<0,05$). Teste de Dunnett mostrou que o número de fibroblastos foi significativamente menor para o grupo Tetraciclina cápsula comparada ao grupo controle. Os grupos Tetraciclina gel e EDTA tiveram significativamente maior inserção de fibroblastos do que o grupo controle (Tabela 5). Teste de Tukey mostrou que os grupos Tetraciclina gel e EDTA tiveram significativamente maior inserção de fibroblastos do que os outros grupos experimentais. O grupo Tetraciclina cápsula tiveram significativamente menor inserção de fibroblastos que o grupo de raspagem e alisamento radicular (Tabela 6).

Adesão do coágulo de Fibrina

Figura 12 mostra o efeito de tratamento de superfície na formação de coágulo de fibrina sobre a dentina. O coágulo de fibrina aderido à dentina (scores-pontuações) para todos os grupos experimentais e grupo controle estão apresentados na Tabela 7. Teste exato de Fisher revelou uma diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p<0,05$). Teste de Dunnett mostrou que o coágulo de fibrina aderido à dentina pelos grupos Tetraciclina gel e raspagem e alisamento radicular foram significativamente maiores do que o grupo controle (Tabela 7). Teste de Tukey mostrou que o grupo Tetraciclina gel teve significativamente maior adesão de coágulo de fibrina do que os grupos Ácido cítrico e Tetraciclina cápsula. O grupo Tetraciclina cápsula teve significativamente menor adesão de coágulo de fibrina do que os grupos de que raspagem e alisamento radicular e EDTA (Tabela 8).

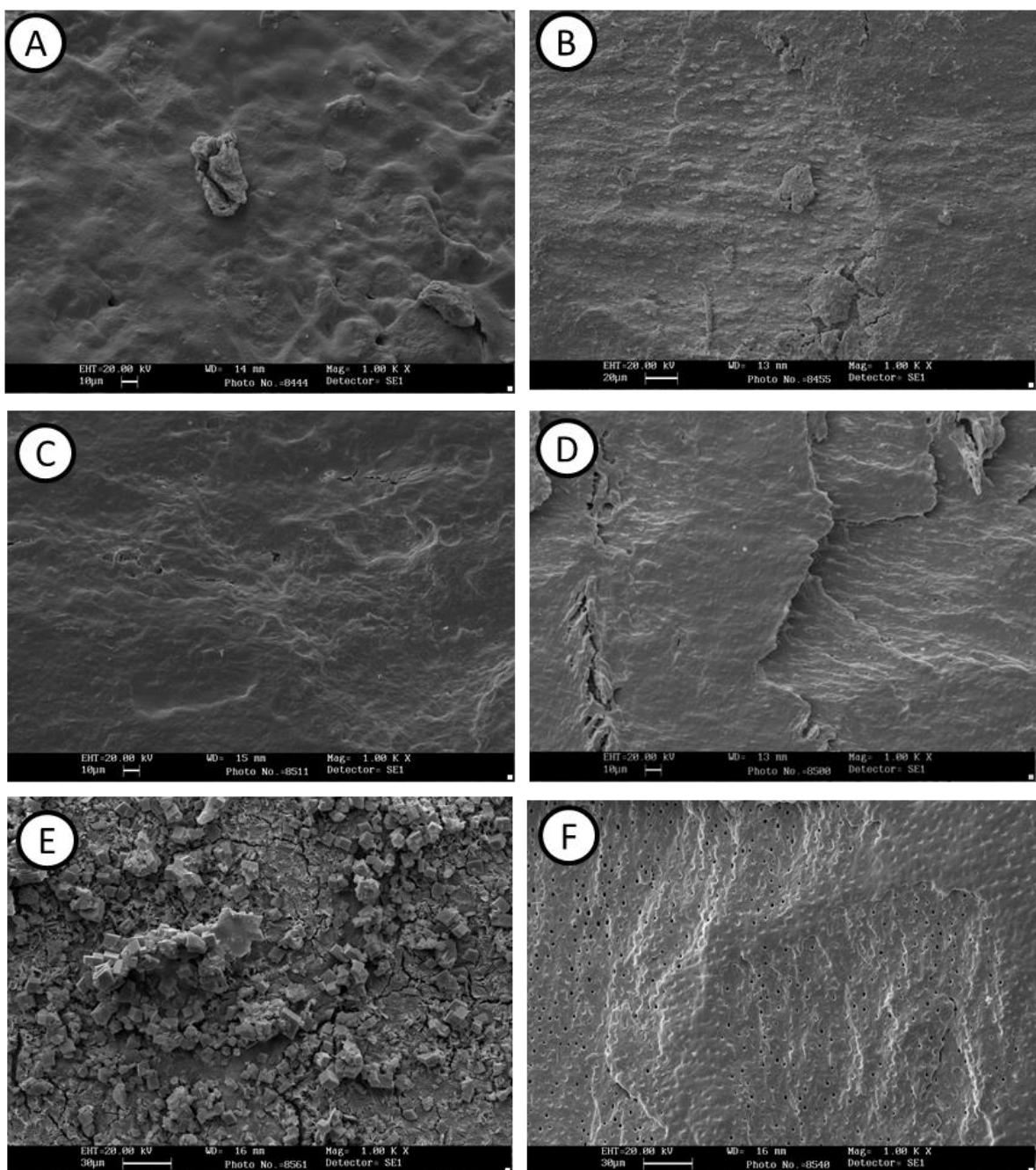


Figura 10. Morfologia da superfície de blocos de dentina humana tratados com cada agente condicionante testado. Área correspondente à parte central da amostra. (A) Grupo Controle com cálculo cobrindo a superfície, (B) Raspagem e Alisamento radicular mostrando smear layer cobrindo os túbulos dentinários, (C) Ácido cítrico apresentando pequena exposição de túbulos dentinários, (D) EDTA mostrando pequena exposição de túbulos dentinários, (E) Cápsula de Tetraciclina com grande quantidade de resíduos de medicamento cobrindo os

túbulos e, (F) Tetraciclina Gel com muita exposição de túbulos dentinários. Aumento 1000X.

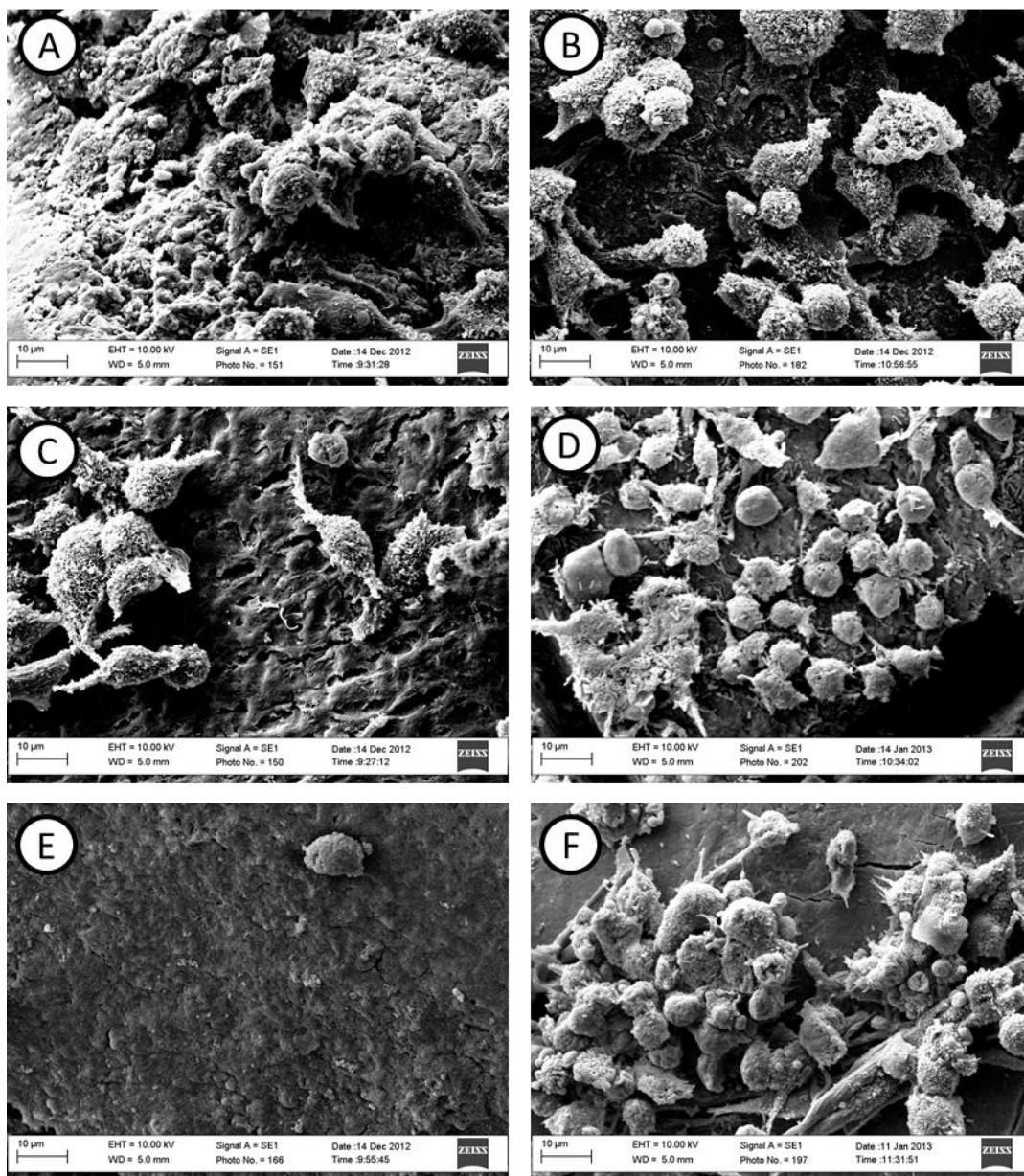


Figura 11. Células de fibroblastos aderidas em blocos de dentina humana. Área correspondente à parte central da amostra. (A) Grupo Controle, (B) Raspagem e Alisamento radicular, (C) Ácido cítrico, (D) EDTA, (E) Cápsula de Tetraciclina, e (F) Tetraciclina Gel. Aumento 3000X.

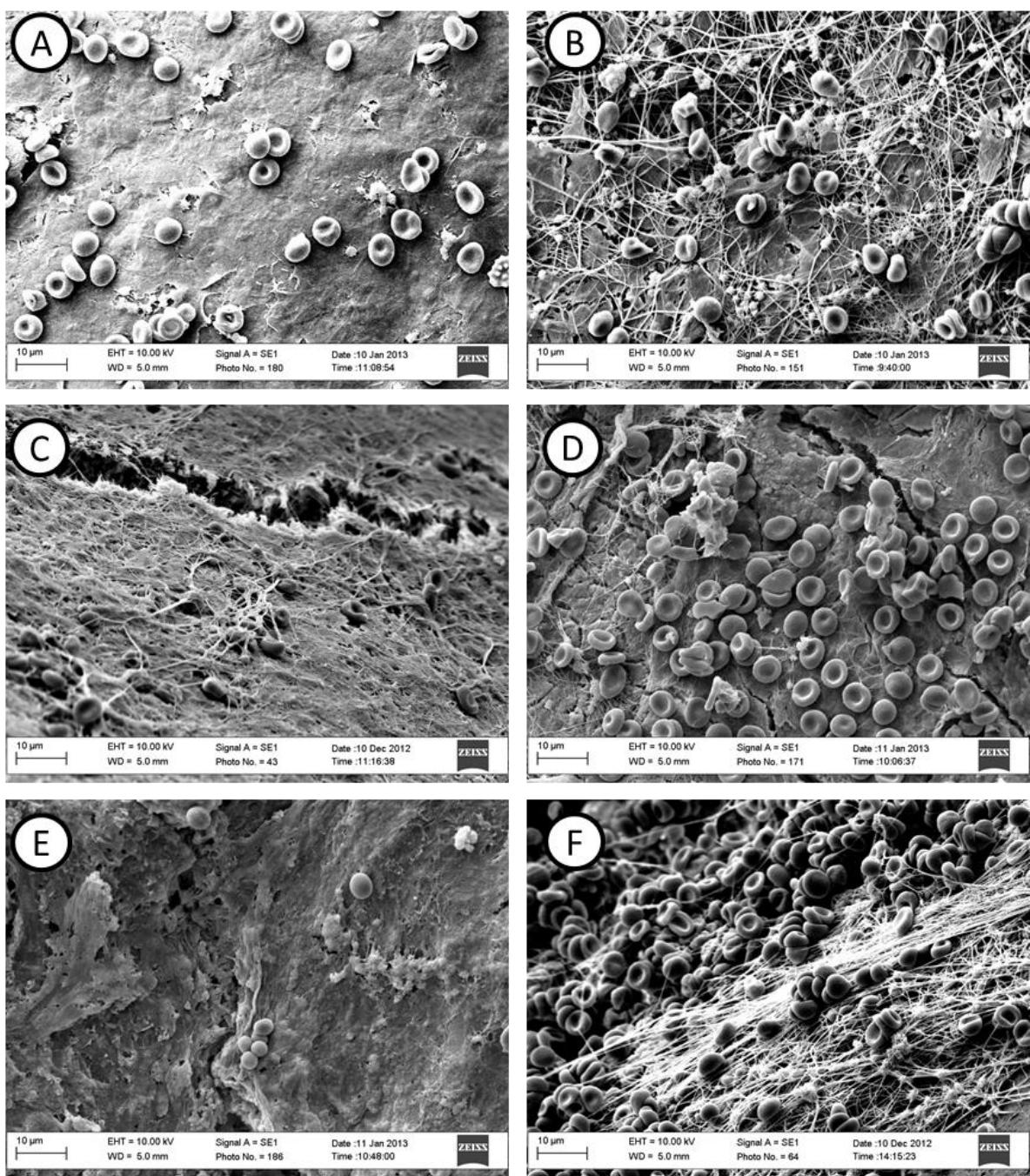


Figura 12. Efeito do tratamento de superfície na formação de coágulo de fibrina na dentina. Área correspondente à parte central da amostra. (A) Grupo Controle - escassa rede de fibrina e/ou de células sanguíneas (score 1), (B) Raspagem e Alisamento radicular - moderada quantidade de células sanguíneas e moderada rede de fibrina (score 2), (C) Ácido cítrico - escassa rede de fibrina e/ou de células sanguíneas (score 1), (D) EDTA - moderada quantidade de células sanguíneas e moderada rede de fibrina (score 2), (E)

Cápsula de Tetraciclina - escassa rede de fibrina e/ou de células sanguíneas (score 1) , e (F) Tetraciclina Gel - densa rede de fibrina e células sangüíneas aprisionadas (score 3) . Aumento 3000X.

Tabelas

Tabela 1. Scores da presença de smear layer cobrindo a superfície de dentina ($n = 9$), e análise estatística relacionada a significância para grupo controle calculada pelo teste Dunnett.

Grupos			Categoria
	1	2	Estatística (Teste de Dunnett)
Controle	na	na	-
Tetraciclina Cápsula	na	na	-
Tetraciclina Gel	-	9	A
EDTA	-	9	A
Ácido Cítrico	-	9	A
Raspagem e Alisamento	9	-	B
Radicular			

na- não se aplica; (p <0,05); 1 – score correspondente à presença de grande quantidade de smear layer; 2 – score correspondente à ausência de smear layer

Tabela 2. Scores para a presença de resíduos do produto cobrindo a superfície de dentina ($n = 9$), e análise estatística relacionada a significância para grupo controle calculada pelo teste Dunnett.

Grupos			Categoria
	1	2	Estatística (Teste de Dunnett)
Controle	na	na	-
Raspagem e Alisamento	na	na	-
Radicular			
Tetraciclina Gel	-	9	A
EDTA	-	9	A
Ácido Cítrico	-	9	A
Tetraciclina Cápsula	9	-	B

na-não se aplica; (p <0,05); 1- score correspondente à presença de grande quantidade de resíduos do produto; 2- score correspondente à nenhum resíduo do produto deixado com o uso.

Tabela 3. Média e desvio padrão (DP) da viabilidade celular para os grupos controle e experimentais ($n = 9$), e valores de P calculados pelo teste de Dunnett.

Grupos	Média (DP)	Valor P	Significância	
			versus	Grupo Controle (Teste de Dunnett)
Controle	0.78 (0.12)	-	-	
Tetraciclina Gel	0.91 (0.12)	P = 0.487	NS	
Ácido Cítrico	0.63 (0.08)	P = 0.040	*	
EDTA	0.60 (0.07)	P = 0.031	*	
Tetraciclina Cápsula	0.59 (0.06)	P = 0.013	*	
Raspagem e Alisamento	0.58 (0.11)	P = 0.010	*	
Radicular				

NS: Não significativo; *: Significativo;(p <0,05).

Table 4. Média e desvio padrão (DP) da viabilidade celular para os grupos experimentais ($n = 9$) e categorias estatísticas definidas pelo teste Tukey HSD test.

Grupos	Média (DP)	Categoria (Teste de Tukey)	Estatística
Tetraciclina Gel	0.91 (0.12)	A	
Ácido Cítrico	0.63 (0.08)	B	
EDTA	0.60 (0.07)	B	
Tetraciclina cápsula	0.59 (0.06)	B	
Raspagem e Alisamento	0.58 (0.11)	B	
Radicular			

(p <0,05)

Tabela 5. Média de valores células dos fibroblastos (N) e desvios padrão (DP) dos grupos controle e experimental (n=9), e valor de P calculado pelo teste Dunnett .

Grupos	Média (DP)	Valor P	Significância	
			versus	Grupo
			Controle	(Teste de Dunnett)
Controle	17.4 (10.5)	-	-	
Tetraciclina Gel	31.1 (8.2)	P = 0.002	*	
EDTA	28.2 (6.3)	P = 0.025	*	
Raspagem e Alisamento Radicular	14.9 (7.7)	P = 0.972	NS	
Ácido Cítrico	9.7 (4.4)	P = 0.201	NS	
Tetraciclina cápsula	2.9 (2.0)	P = 0.001	*	

NS: Não significativo; *: Significativo;(p <0,05).

Tabela 6. Média dos valores das células de fibroblastos (DP);categorias estatísticas definidas pelo teste Tukey.

Grupos	Média (DP)		Categoria	Estatística
			(Teste de Tukey)	
Tetraciclina Gel	31.1 (8.2)		A	
EDTA	28.2 (6.3)		A	
Raspagem e Alisamento Radicular	14.9 (7.7)		B	
Ácido Cítrico	9.7 (4.4)		BC	
Tetraciclina Cápsula	2.9 (2.0)		C	

(p <0,05).

Table 7. Scores da adesão de coágulo de fibrina na dentina (n = 9), e significância estatística ao grupo controle calculado pelo teste Dunnett.

Grupos					Significância	versus Controle
	0	1	2	3	versus Controle	Grupo
					(Teste de Dunnett)	
Controle	-	7	2	-	-	
Tetraciclina Gel	-	-	3	6	*	
Raspagem e Alisamento Radicular	-	1	4	4	*	
EDTA	-	7	2	-	NS	
Ácido Cítrico	-	7	2	-	NS	
Tetraciclina Cápsula	1	8	-	-	NS	

NS: Não significativo; *: Significativo;(p <0,05). 0- score correspondente à ausência de rede de fibrina e de células sanguíneas; 1- score correspondente à escassa rede de fibrina e/ou de células sanguíneas; 2- score correspondente à moderada quantidade de células sanguíneas e moderada rede de fibrina; 3- score correspondente à densa rede de fibrina e células sanguíneas aprisionadas.

Tabela 8. Scores das células sanguíneas depositadas sobre dentina (n = 9) para grupos experimentais, e significância estatística calculada pelo teste Dunn's.

Grupos					Categoria
	0	1	2	3	Estatística
					(Teste de Tukey)
Tetraciclina Gel	-	-	3	6	A
Raspagem e Alisamento Radicular	-	1	4	4	AB
EDTA	-	2	3	4	AB
Ácido Cítrico	-	7	2	-	BC
Tetraciclina Cápsula	1	8	-	-	C

(p <0,05). 0- score correspondente à ausência de rede de fibrina e de células sanguíneas; 1- score correspondente à escassa rede de fibrina e/ou de células

sangüíneas; 2- score correspondente à moderada quantidade de células sangüíneas e moderada rede de fibrina; 3- score correspondente à densa rede de fibrina e células sangüíneas aprisionadas.

Discussão

6. DISCUSSÃO

O principal objetivo da terapia periodontal regenerativa é obter a nova inserção dos componentes periodontais sobre à superfície radicular previamente exposta ao meio bucal ou ao cenário subgengival no interior da bolsa periodontal. Embora esse objetivo seja claro, existe na literatura uma grande discussão sobre o tema, principalmente quanto a capacidade da remoção do smear layer e exposição de fibras colágenas .

Métodos mecânicos e químicos têm sido propostos com objetivo de eliminar os depósitos na superfície radicular (Isik et al., 2000; Shetty et al., 2008; Fontanari et al., 2011) dentre os quais destacam-se a raspagem e alisamento radicular. No entanto, como consequência produzem uma fina camada de smear layer de debríis microcristalinos (Shetty et al., 2008; Martins et al., 2011) que estão intimamente associados com a superfície radicular e necessitam ser removidos (Isik et al., 2000; Amireddy et al.,2011). A desmineralização da superfície radicular com vários agentes químicos, tem sido propostos por eliminar esses depósitos citotóxicos das superfícies radiculares e descalcificar a superfície radicular, expondo a matriz colágena da dentina, facilitando a formação de uma nova inserção (Polson & Proye, 1983; Fennyhough & Page, 1983).

Devido a diversidade de estudos e resultados que relacionam os diferentes tipos de metodologia, empregada com a finalidade de avaliar a superfície radicular após a sua biomodificação por meio de recursos mecânicos e químicos, o presente estudo foi desenvolvido com a finalidade de avaliar os seguintes parâmetros: a presença de smear layer e de resíduos dos produtos, a adesão de fibroblastos e a adesão de componentes sanguíneos, e o metabolismo celular de fibroblastos, em superfícies radiculares submetidas a nenhum tipo de tratamento e/ou com tratamento por meio de raspagem e alisamento radicular associada ou não ao uso de diferentes agentes químicos:ácido cítrico, EDTA, tetraciclina cápsula e tetraciclina gel.

Raspagem radicular tem por finalidade a remoção de depósitos, bem como cemento e dentina contaminados, além de fornecer uma melhor ação dos agentes biomodificadores da raiz dental (Lee et al., 2010; Fontanari et al., 2011; Amaral et al., 2011). Fato também observado neste estudo, superfícies que receberam apenas o tratamento de raspagem e alisamento radicular apresentaram significativamente uma maior cobertura de smear layer sobre a superfície dentinária, em contrapartida, para os grupos tetraciclina gel, EDTA e ácido cítrico foi apresentado remoção de smear layer, exposição dos túbulos dentinários e ausência de resíduos dos seus produtos (figura 10). Aspectos esses que segundo Soares et al. (2010), contribuem para adesão da fibrina e células dos fibroblastos, que consequentemente otimizam o padrão de regeneração dos tecidos periodontais de inserção.

Neste estudo, a tetraciclina cápsula mostrou quantidade significativamente maior de resíduos sobre a superfície de dentina radicular (figura 10 E) provavelmente porque os componentes presentes dentro das cápsulas de tetraciclina não foram completamente dissolvidos. Segundo Soares et al. (2010) a presença desses resíduos durante longo período de tempo pode resultar em contínua desmineralização da dentina radicular ou ainda criar aberturas onde podemos observar a falta de inserção de tecido (Ishi et al., 2008). Além disso, este procedimento é capaz de produzir uma superfície irregular com muitas depressões após desmineralização (Chandra et al., 2005; Soares et al., 2010).

Entendendo a importância do uso desses agentes biomodificadores, um dos primeiros agentes a ser utilizado foi o ácido cítrico (Lee et al., 2010; Soares et al. , 2010 ; Fontanari et al., 2011 ; Martins et al., 2011) por ter características de remover smear layer, expor túbulos, promover desmineralização, expor matriz colágena e promover adesividade mecânica. No nosso estudo o grupo representado por este agente apresentou pequena exposição de túbulos dentinários. (figura 10 C). O entusiasmo científico ao redor do ácido cítrico começou a ser questionado quando trabalhos analisaram seu efeito necrotizante, devido seu baixo pH. Assim, outras substâncias começaram a

ser testadas, na tentativa de se conseguir um agente ideal para o condicionamento químico da superfície radicular.

O cloridrato de tetraciclina foi então estudado e muitas características foram observadas. (Soares et al., 2010; Shetty et al., 2011). Em estudos realizados *in vitro*, mostraram aumento da adesão da glicoproteína fibronectina à dentina, estimulando a proliferação e adesão de fibroblastos, bem como promovendo a supressão do crescimento de células epiteliais (Isik et al., 2000). Outras propriedades observadas foram atividade anticolagenase (Golub et al., 1984), inibição da função dos osteoclastos (Gomes et al., 1984) e função neutrofílica (Gabler & Creamer, 1991), bem como eficiente substantividade (Isik et al., 2000). Porém, os efeitos adversos também começaram a aparecer. O cloridrato de tetraciclina também apresenta pH ácido, levando a uma relação inversamente proporcional entre o pH e a concentração da solução, fatores que podem interferir na viabilidade celular e nos eventos iniciais de cicatrização periodontal (Blomlöf & Lindskog, 1995).

Após alguns resultados negativos com a utilização desses agentes, de baixo pH e possíveis necrose de tecido gengival, um agente de pH neutro, denominado EDTA, parecia ser a solução (Blomlöf et al., 1996). Sendo assim, considerando-se que um material para utilização em tecidos dentários necessita ser atóxico em períodos curtos e longos (Lee et al., 2010), a presente pesquisa avaliou a influência dos agentes desmineralizantes na viabilidade celular de fibroblastos em 4h e apesar de alguns resultados contraditórios na literatura, tivemos como resultados a ausência de citotoxicidade da tetraciclina gel, que obteve resultados similares ao grupo controle.

Quando o EDTA parecia ser o agente ideal, uma nova metodologia como avaliar a adesão de elementos sanguíneos sobre a raiz previamente condicionada, visando simular *in vitro* o mais próximo do que ocorria *in vivo*. Estes estudos de adesão de células sanguíneas (Leite et al., 2005 ; Amireddy et al., 2011) mostraram que em superfícies previamente condicionadas com gel de EDTA ocorria a adesão de elementos sanguíneos, porém as superfícies

radiculares condicionadas com solução salina mostravam maior quantidade de células sanguíneas aderidas e entrelaçadas na rede de fibrina. Fato justificado pela forma do gel, que pode criar uma película sobre a superfície radicular ou mesmo penetrar na rede de fibrina dificultando sua remoção e assim impedindo a adesão do coágulo (Minocha & Rahul, 2012). No presente estudo, superfícies radiculares apenas raspadas obtiveram moderada quantidade de células sanguíneas e moderada rede de fibrina, que foi significativamente melhor comparada aos grupos controle, ácido cítrico, EDTA e tetraciclina cápsula, exceto a tetraciclina gel (figura 12).

Como os protocolos são muito diversificados um grupo de pesquisadores (Soares et al., 2010; Shetty et al., 2011; Minocha & Rahul, 2012) vem testando diversos agentes biomodificadores, visando atingir concentração, tempo, pH e modo de aplicação de cada substância.

A exposição da matriz colágena da dentina ou do cimento estimula a regeneração ou a reparação das estruturas de suporte periodontais (Kassab & Cohen, 2003), através da exposição existente do colágeno tipo I nesta matriz, que parece ser quimiotática para células de neutrófilos polimorfonucleares, macrófagos e fibroblastos (Fernyhough & Page, 1983; Lee et al., 2010) e esta matriz providencia um substrato para a formação de rede de fibrina (Leite et al., 2005; Baker et al., 2005). Deste modo, será possível a adesão e migração de fibroblastos e rápida adesão do coágulo na superfície radicular devido a afinidade entre as fibras colágenas e o sangue. E por sua vez, a adesão do coágulo aparece ser vitalmente dependente da formação de união entre o coágulo e a superfície radicular (Baker et al., 2005).

A exposição do colágeno pode levar a ter mais fibrina e células sanguíneas inseridas na superfície radicular (Leite et al., 2005; Baker et al., 2005; Minocha & Rahul, 2012). Este experimento demonstrou que o tratamento com a tetraciclina gel promoveu a mais organizada rede de fibrina e o aprisionamento celular, provavelmente relacionada à exposição da fibra colágena, que foi maior neste grupo (figura 11 e 12). Além disso, estudos *in*

vitro tem mostrado que a desmineralização com a tetraciclina gel (Isik et al., 2000) e o EDTA (Amaral et al., 2011) podem aumentar a adesão de células de fibroblastos na superfície radicular. No nosso estudo, utilizamos o método de avaliação da adesão de fibroblastos por meio do MEV, com um destaque que foi dado ao grupo do EDTA que juntamente a tetraciclina gel, foram os grupos que apresentaram melhor adesão de fibroblastos (figura 11), e não houve diferença estatisticamente significante entre ambos (tabela 5).

Apesar de tantos fatores analisados, é imprescindível discutir que a terapia mecânica está vinculada a terapia química, por sua vez, são capazes de promoverem: a desmineralização da superfície dentinária, exposição da matriz protéica, formação inicial de coágulo sanguíneo, resultando em maior número de fibroblastos, aderidos e inseridos e maior rede de fibrina, com inserção conjuntiva obtida, sobre superfícies radiculares, que uma vez foram expostas à periodontite.

No nosso estudo utilizamos como metodologia a microscopia eletrônica de varredura (figuras 10, 11 e 12), demonstrando esse ser um método efetivo a medida que avaliou por um método qualitativo, por meio de imagens obtidas do centro de cada espécime. Os estudos de MEV ainda permanecem como uma forma de avaliar a inserção de coágulo de fibrina e células de fibroblastos nas superfícies radiculares tratadas. O método descrito pode ser considerado um método indireto de confirmar a inserção do coágulo de fibrina e células de fibroblastos para as superfícies radiculares. O presente estudo é uma avaliação previsível da presença de células na superfície radicular e a eficácia do presente método pode ser melhor avaliado pela quantificação apropriada das áreas denominadas.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

Com base na metodologia aplicada no presente estudo pode- se concluir que:

- Todas as substâncias utilizadas, exceto a cápsula de tetraciclina, foram capazes de remover a smear layer quando comparadas ao grupo controle;
- Nem todas as substâncias efetivamente promoveram descontaminação da superfície radicular, removeram a smear layer e tiveram exposição das fibras colágenas;
- Tetraciclina gel foi capaz de providenciar um aumento significativo na adesão de rede de fibrina e de células de fibroblastos nas superfícies radiculares, quando comparada aos outros grupos;
- Tetraciclina gel apresentou ausência de citotoxicidade, com resultados similares ao grupo controle, por ser uma substância atóxica;
- A biomodificação radicular, consistindo na remoção de smear layer e exposição de fibras colágenas, proporcionou uma maior adesão de fibroblastos à superfície radicular, e consequentemente maior adesão de componentes sanguíneos;
- A remoção de smear layer, com consequente exposição das fibras colágenas são necessários para a adesão do coágulo à superfície dental.

Referências

REFERÊNCIAS

- 1- Adriaens PA, Edwards CA, De Boever JA, Loesche WJ. Ultrastructural observations on bacterial invasion in cementum and radicular dentin of periodontally diseased human teeth. **J Periodontol.** 1988;59(8):493-503.
- 2- Aleo JJ, De Renzis FA, Farber PA, Varboncoeur AP. The presence and biologic activity of cementum-bound endotoxin. **J Periodontol.** 1974;45(9):672-5.
- 3- Amaral NG, Rezende ML, Hirata F, Rodrigues MG, Sant'ana AC, Greghi SL, et al. Comparison among four commonly used demineralizing agents for root conditioning: a scanning electron microscopy. **J Appl Oral Sci.** 2011;19(5):469-75.
- 4- **AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY.** Glossary of Periodontic Terms: Supplement, Chicago, Nov, 1988.
- 5- Amireddy R, Rangarao S, Lavu V, Madapusi BT. Efficacy of a root conditioning agent on fibrin network formation in periodontal regeneration: A SEM evaluation. **J Indian Soc Periodontol.** 2011;15(3):228-34.
- 6- Babay N. Nondiseased dentinal root surface following citric acid or tetracycline hydrochloride conditioning: a scanning electron microscopic study on the effects of ultrasonic irrigation before and after root conditioning. **Quintessence Int.** 1997;28(2):93-7.
- 7- Baker PJ, Rotch HA, Trombelli L, Wikesjö UM. An in vitro screening model to evaluate root conditioning protocols for periodontal regenerative procedures. **J Periodontol.** 2000;71(7):1139-43.
- 8- Baker DL, Stanley Pavlow SA, Wikesjö UM. Fibrin clot adhesion to dentin conditioned with protein constructs: an in vitro proof-of-principle study. **J Clin Periodontol.** 2005;32(6):561-6
- 9- Bergenholtz A, Babay N. Scanning electron microscopy of the root surface texture of extracted periodontally diseased teeth following various etching and chelating regimens. **Int J Periodontics Restorative Dent.** 1998;18(2):171-9.
- 10- Blomlöf J, Lindskog S. Periodontal tissue-vitality after different etching modalities. **J Clin Periodontol.** 1995;22(6):464-8
- 11- Blomlöf JP, Blomlöf LB, Lindskog SF. Smear removal and collagen exposure after non-surgical root planing followed by etching with an EDTA gel preparation. **J Periodontol.** 1996;67(9):841-5.
- 12- Bosshardt DD, Selvig KA. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. **Periodontol 2000.** 1997;13:41-75.

- 13- Caffesse RG, De LaRosa M, Garza M, Munne-Travers A, Mondragon JC, Weltman R. Citric acid demineralization and subepithelial connective tissue grafts. **J Periodontol.** 2000;71(4):568-72.
- 14- Cavassim R, Leite FR, Zandim DL, Dantas AA, Rached RS, Sampaio JE. Influence of concentration, time and method of application of citric acid and sodium citrate in root conditioning. **J Appl Oral Sci.** 2012 ;20(3):376-83.
- 15- Chandra RV, Bhat KM, Jagetia GC. Trypan blue exclusion principle in the evaluation of fibroblast attachment in vitro using V79 cells on the conditioned root surface. **Quintessence Int** . 2005;36(9):702-706
- 16- Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. **J Clin Periodontol.** 1988;15(5):316-23.
- 17- Farnyough W, Page RC. Attachment, growth and synthesis by human gingival fibroblasts on demineralized or fibronectin-treated normal and diseased tooth roots. **J Periodontol.** 1983;54(3):133-40.
- 18- Ferraris M.A., Muñoz C.A. **Histología e Embriología bucodental.** 2 ed. Guanabara Koogan;2006.
- 19- Fine AS. Bioquímica da cicatrização das feridas. **Cirurgia periodontal: bases biológicas e técnicas.** 1981; 60-121.
- 20- Fontanari LA, Pinto SC, Cavassim R, Spin-Neto R, Ishi Ede P, Sampaio JE. Influence of dental exposure to oral environment on smear layer removal and collagen exhibition after using different conditioning agents. **Braz Dent J.** 2011;22(6):479-85.
- 21- Fontanari LA, Sampaio JEC. **Biomodificação radicular em dentes expostos e não expostos à placa bacteriana.** [Dissertação] Araraquara: Universidade estadual paulista; 2010.
- 22- Gabler WL, Creamer HR. Suppression of human neutrophil functions by tetracyclines. **J Periodontal Res.** 1991;26(1):52-8
- 23- Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. **J Periodontol.** 1996 ;67(10):1041-9.
- 24- Gestrelus S, Zetterstrom O, Andersson C. In vitro studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative. **J Clin periodontol.** 1997; 24: 685-92.

- 25- Golub LM, Ramamurthy N, McNamara TF, Gomes B, Wolff M, Casino A, et al. Tetracyclines inhibit tissue collagenase activity. A new mechanism in the treatment of periodontal disease. **J Periodontal Res.** 1984;(19): 651-655
- 26- Gomes BC, Golub LM, Ramamurthy NS. Tetracyclines inhibit parathyroid hormone-induced bone resorption in organ culture. **Experientia.** 1984; 40(11):1273-1275
- 27- Ishi EP, Dantas AA, Batista LH, Onofre MA, Sampaio JE. Smear layer removal and collagen fiber exposure using tetracycline hydrochloride conditioning. **J Contemp Dent Pract.** 2008;9(5):25-33
- 28- Isik AG, Tarim B, Hafez AA, Yalçın FS, Onan U, Cox CF. A comparative scanning electron microscopic study on the characteristics of demineralized dentin root surface using different tetracycline HCl concentrations and application times. **J Periodontol.** 2000;71(2):219-25.
- 29- Işık G, Ince S, Sağlam F, Onan U. Comparative SEM study on the effect of different demineralization methods with tetracycline HCl on healthy root surfaces. **J Clin Periodontol.** 1997;24(9 Pt 1):589-94.
- 30- Kassab M, Cohen RE. The effect of root modification and biomodification on periodontal therapy. **Compend Contin Educ Dent.** 2003;24(1):31-34
- 31- Kina JR, Kina J, Kina EF, Kina M, Soubhia AM. Presence of bacteria in dentinal tubules. **J Appl Oral Sci.** 2008;16(3):205-8.
- 32- Lafferty TA, Gher ME, Gray JL. Comparative SEM study on the effect of acid etching with tetracycline HCl or citric acid on instrumented periodontally-involved human root surfaces. **J Periodontol.** 1993;64(8):689-93.
- 33- Lee JY, Seol YJ, Park JR, Park YJ, Chung CP. Biological effects of a root conditioning agent for dentin surface modification in vitro. **J Periodontal Implant Sci.** 2010;40(6):257-64
- 34- Leite FR, Moreira CS, Theodoro LH, Sampaio JE .Blood cell attachment to root surfaces treated with EDTA gel. **Braz Oral Res.** 2005;19(2):88–92
- 35- Leite FR, Sampaio JE, Zandim DL, Dantas AA, Leite ER, Leite AA. Influence of root-surface conditioning with acid and chelating agents on clot stabilization. **Quintessence Int.** 2010;41(4):341-9.
- 36- Lindhe J,Karring T,Lang NP. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral.** 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.
- 37- Lindhe J, Lang NP, Karring T. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral.** 5 ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan; 2010.

- 38- Lotufo RF, Flynn J, Chen C, Slots J. Molecular detection of *Bacteroides forsythus* in human periodontitis. **Oral Microbiol Immunol.** 1994;9(3):154-60.
- 39- Magalhães D. **Avaliação histobacteriológica de dentes com doença periodontal.**[Dissertação] Ribeirão Preto:Faculdade de Odontologia /USP; 1989
- 40- Mariotti A. Efficacy of chemical root surface modifiers in the treatment of periodontal disease. A systematic review. **Ann Periodontol.** 2003;8(1):205-26.
- 41- Martins Júnior W, De Rossi A, Samih Georges Abi Rached R, Rossi MA. A scanning electron microscopy study of diseased root surfaces conditioned with EDTA gel plus Cetavlon after scaling and root planing. **J Electron Microsc.** 2011;60(2):167-75
- 42- Minocha T, Rahul A. Comparison of fibrin clot adhesion to dentine conditioned with citric acid, tetracycline, and ethylene diamine tetra acetic acid: An in vitro scanning electron microscopic study. **J Indian Soc Periodontol.** 2012;16(3):333-41.
- 43- Morioka M, Hinode D, Nagata A, Hayashi H, Ichimiya S, Ueda M, et al. Cytotoxicity of *Porphyromonas gingivalis* toward cultured human gingival fibroblasts. **Oral Microbiol Immunol.** 1993;8(4):203-7.
- 44- Nanci A, Cate Ten. **Histologia Oral- Desenvolvimento, estrutura e função.** 7 ed. Rio de Janeiro : Elsevier;2008.
- 45- Oda JY, Carvalho J. Cicatrização do periodonto: revisão. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar.** 2004;8(2):159-72.
- 46- Oliveira BDSD, Souza ELBD, Júnior ADAG, Leite EBDA ,Ramos CG, Gusmão EDS. Emprego do ácido cítrico, EDTA e Tetraciclina no condicionamento da superfície radicular,associado ao tratamento mecânico convencional. **Odontologia Clínico-Científica.** 2002;1(3):169-72.
- 47- Parashis AO, Tsiklakis K, Tatakis DN. EDTA gel root conditioning: lack of effect on clinical and radiographic outcomes of intrabony defect treatment with enamel matrix derivative. **J Periodontol.** 2006 ;77(1):103-10.
- 48- Polson AM, Proye MP. Fibrin linkage: a precursor for new attachment. **J Periodontol.** 1983;54(3):141-7.
- 49- Polson AM, Frederick GT. Cell processes in dentin tubules during early phases of attachment to demineralized periodontitis-affected surfaces. **J Clin Periodontol.** 1985;12(2):162-9.
- 50- Shetty B, Dinesh A, Seshan H. Comparative effects of tetracyclines and citric

acid on dentin root surface of periodontally involved human teeth: A scanning electron microscope study. **J Indian Soc Periodontol.** 2008;12(1):8-15.

51- Srirangarajan S, Ravindra S, Aparna S, Thakur S. EDTA-S: A novel root conditioning agent. **J Indian Soc Periodontol.** 2012;16(1):70-3.

52- Silvério KG, Martinez AE, Rossa C Jr. Effects of basic fibroblast growth factor on density and morphology of fibroblasts grown on root surfaces with or without conditioning with tetracycline or EDTA. **J Oral Sci.** 2007;49(3):213-20.

53- Slots J, Genco RJ. Black-pigmented Bacteroides species, Capnocytophaga species, and Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. **J Dent Res.** 1984;63(3):412-21.

54- Slots J, Listgarten MA. Bacteroides gingivalis, Bacteroides intermedius and Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal diseases. **J Clin Periodontol.** 1988;15(2):85-93.

55- Soares PBF, Castro CG, Branco CA, Magalhães D, Neto AJF, Soares CJ. Mechanical and acid root treatment on periodontally affected human teeth - a scanning electronic microscopy. **Braz J Oral Sci.** 2010;9(2):128-132.

56- Socransky SS. Microbiology of periodontal disease -- present status and future considerations. **J Periodontol.** 1977;48(9):497-504.

57- Takata T. Oral wound healing concepts in periodontology. **Curr. Opin. Periodontol.** 1994;119-27.

58- Ten Cate AR. **Histologia bucal- Desenvolvimento, estrutura e função.** 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

59- White DJ. Dental calculus: recent insights into occurrence, formation, prevention, removal and oral health effects of supragingival and subgingival deposits. **Eur J Oral Sci.** 1997;105(5 Pt 2):508-22.

60- Zaman KU, Sugaya T, Hongo O, Kato H. A study of attached and oriented human periodontal ligament cells to periodontally diseased cementum and dentin after demineralizing with neutral and low pH etching solution. **J Periodontol.** 2000;71(7):1094-9.

Anexos

ANEXOS



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 – Bloco A – Sala 224 - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: cep@cepoce.ufu.br; [www.comissões.cep.ufu.br](http://www.comissoes.cep.ufu.br)

ANÁLISE FINAL Nº. 267/11 DO COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU
041/11

Projeto Pesquisa: Análise da morfologia e adesão de fibroblastos sobre superfície radicular afetada periodontalmente pós tratamento químico.

Pesquisador Responsável: Denildo Magalhães

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.

b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.

c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Entrega de Relatório Parcial: **novembro de 2011.**

Entrega de Relatório Final: **novembro de 2012.**

SITUAÇÃO: PROTOCOLO APROVADO

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 13 de maio de 2011.

Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do CEP/UFU