**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

GIOVANA FUZETO VERONESI

**Efeitos do condicionamento com diferentes soluções e tempos de
aplicação na descontaminação da superfície radicular, adesão e
proliferação de fibroblastos gengivais e de ligamento periodontal:
estudo em microscopia eletrônica de varredura**

**BAURU
2018**

GIOVANA FUZETO VERONESI

Efeitos do condicionamento com diferentes soluções e tempos de aplicação na descontaminação da superfície radicular, adesão e proliferação de fibroblastos gengivais e de ligamento periodontal: estudo em microscopia eletrônica de varredura

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Reabilitação Oral, linha de pesquisa em Periodontia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Adriana C. Passanezi Sant'Ana

Versão Corrigida

BAURU
2018

V599e Veronesi, Giovana Fuzeto
Efeitos do condicionamento com diferentes soluções e tempos de aplicação na descontaminação da superfície radicular, adesão e proliferação de fibroblastos gengivais e de ligamento periodontal: estudo em microscopia eletrônica de varredura / Giovana Fuzeto Veronesi. – Bauru, 2018.
136p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof^a. Dr^a. Adriana C. Passanezi Sant'Ana

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Nº CAAE 45955615.0.0000.5417
Data: 03/08/2015

FOLHA DE APROVAÇÃO

DADOS CURRICULARES
GIOVANA FUZETO VERONESI

Nascimento	29 de dezembro de 1991
Naturalidade	São Bernardo do Campo – SP
Filiação	Rodolfo Guilherme Vieira Veronesi Paula Cristina Fusetto
2011-2014	Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (Bauru, SP)
2014	Bolsista de Iniciação Científica em Radiologia, pelo programa da Reitoria da Universidade de São Paulo
2014	Participante do programa das Nações Unidas, na Universidade de Odontologia de Michigan (Ann Arbor, MI)
2015-2018	Mestrado em Ciências Odontológicas Aplicadas, área de concentração em Reabilitação Oral com linha de pesquisa em Periodontia. Bolsista CAPES.
2016	Estágio na Università Degli Studi di Roma – La Sapienza (Roma, IT)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Anete, que sempre vibrou com as minhas conquistas e me acompanhou com carinho pela vida não apenas como avó mas também como grande amiga, e está comigo em todo lugar que estou.

Dedico aos meus pais, Rodolfo e Paula, e meu irmão Guilherme, que são meu alicerce, meu orgulho, e meu maior amor. Se cheguei até aqui, foi com vocês e por vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à toda a minha família, pais, irmão, avós, tias, tios e primos, que sempre me apoiaram e deram suporte para alcançar meus sonhos. Não poderia pedir maior benção do que a família em que nasci. A todos eles, sou eternamente grata.

Roberto, a você, agradeço por tudo. Desde os momentos de alegria aos momentos de dúvida, você esteve ao meu lado me acompanhando durante toda esta caminhada. Sempre me apoiando, sempre me incentivando.

À minha querida orientadora, Adriana, que desde a graduação me ensina com sua paciência e doçura. Muito obrigada pelo caminho que me auxiliou a traçar, sua ajuda, conhecimento, ensinamentos, compreensão e palavras foram essenciais no meu crescimento profissional e pessoal.

Às minhas amigas de vida, Thaís, Carine, Andressa, Nathália e de faculdade, Júlia, Fernanda Coelho, Karol, Fernanda Moro, Camila Bonassa, que estão do meu lado, mesmo longe, mesmo há quilômetros de distância. A vida nos distancia, mas nosso amor e amizade nos une hoje e sempre. Deixo aqui no papel, minha gratidão por momentos de felicidade, de ajuda, de carinho

Aos meus amigos de mestrado, Ísis, Erika, Matheus, Andréia, Adriana, Paula, Luísa, Raphaella, Rafael, Vitor, Gustavo, agradeço imensamente pelos momentos compartilhados, pelas experiências acadêmicas e de vida. A amizade, ajuda e companhia de vocês fez meus dias em Bauru mais fáceis e felizes. Levarei cada um de vocês comigo.

A todos os professores do departamento, Malu, Carla e Sebastião, que sempre estiveram dispostos a ajudar, ensinar e tanto enriqueceram meus conhecimentos nestes anos. Em especial à professora Mariana, que em tantos momentos esteve presente durante minha jornada, e me fez crescer, aprender e superar desafios. Obrigada pelos conhecimentos compartilhados e pela vontade de ensinar, sou muito grata por ter tido a oportunidade de aprender com você.

As funcionárias departamento, Ivânia, Edilaine e Marcela, muito obrigada por toda a ajuda prestada durante esses anos. No departamento, ou nas clínicas, o suporte de vocês é fundamental diariamente. Obrigada pela convivência!

Aos funcionários que me auxiliaram em diferentes partes da execução do meu projeto. Regina Célia, pelo carinho, empenho e imensa ajuda na coleta dos dentes. Ao Edimauro, pela colaboração fundamental na obtenção das imagens do MEV. Ao professor Rodrigo, colegas e funcionários do CIP, pela ajuda e conhecimentos prestados sempre que necessário. Especialmente à Cíntia Tokuhara e Rafaela Alves, que em muitos momentos se mostraram solícitas e empenhadas em colaborar com meus experimentos e a sanar minhas dúvidas.

Aos meus pacientes que confiaram em minhas mãos e meu conhecimento para trata-los, sempre me agradecendo com um sorriso no rosto. É para vocês que tudo isso é realizado. O amor pela odontologia e a vontade de proporcionar sempre o melhor tratamento aos nossos pacientes, que nos leva a estudar mais e mais a cada dia.

Agradeço a todos que de alguma forma participaram do meu crescimento pessoal e agregaram direta ou indiretamente algo de valor a este trabalho e à minha vida.

Agradeço a Deus por me guiar, iluminar e dar forças em momentos de dificuldade; mas principalmente por me proporcionar a experiência de momentos únicos, e de poder compartilhá-los com pessoas excepcionais. Sou grata por todas as bênçãos que recebi durante toda a minha vida. Enquanto eu puder, devolverei para o mundo, fazendo o meu melhor.

“O amor é a força mais abstrata e também a mais potente que há no mundo”

Gandhi

“Aprendi que a coragem não é a ausência do medo, mas o triunfo sobre ele”

Nelson Mandela

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar *in vitro* a influência do tratamento de superfícies radiculares na adesão e proliferação de fibroblastos gengivais e de ligamento periodontal humano em fragmentos radiculares de dentes humanos extraídos por razões periodontais. Todos os fragmentos receberam raspagem e alisamento radicular (RAR), e em seguida aleatoriamente divididos em grupos, de acordo com a substância utilizada no tratamento de superfície (n= 15/grupo): ácido fosfórico 37% aplicado por 90s (AF90) ou 180s (AF180) (RAR); EDTA 24% aplicado por 90s (EDTA90) ou 180s (EDTA180); ácido cítrico pH 1.0 a 10% aplicado por 90s (AC90) ou 180s (AC180); ácido cítrico pH 1.0 a 10% associado à tetraciclina 50% por 90s (ACTC90) ou 180s (ACTC180); tetraciclina hidrocloreídica (50mg/ml) aplicada por 90s (TC90) ou 180s (TC180). O grupo controle foi composto por fragmentos tratados por meio de RAR seguido de lavagem em soro fisiológico. Após a realização dos tratamentos, os espécimes (n=3/grupo) foram preparados para análise em MEV com o objetivo de avaliar a descontaminação das superfícies radiculares por meio dos índices de rugosidade superficial (IRS), cálculo residual (ICR), perda de substância dentária (IPSD), presença de restos teciduais (IPRT), remoção de *smear layer* (IRSL), abertura dos túbulos dentinário (ATD) e *smear layer* remanescente (SLR) em fotomicrografias em aumentos de 500x e 1000x. Em 6 espécimes de cada grupo, foram plaqueados 10⁴ fibroblastos gengivais (FGH-1), e em outros 6, 10⁴ fibroblastos de ligamento periodontal humano (FLP-1). Após 24h foram fixados 6 espécimes por grupo (n=3/grupo) e após 48h os outros 6 espécimes (n=3/grupo), para análise em microscópio eletrônico de varredura. Para determinar a adesão e proliferação celular, o número de células aderidas à superfície nos dois períodos de avaliação foi determinado em triplicatas por um examinador independente. A comparação entre os grupos foi realizada pelo método Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn para variáveis não lineares, e por meio de análise de variância múltipla (ANOVA) complementado pelo teste de Tukey para as variáveis lineares. A comparação entre os pares nos períodos de 24 e 48 horas foi realizada por meio do método ANOVA pós-teste Sidak para variáveis lineares, e Kruskal Wallis pós-teste Dunn para variáveis não lineares. Foi adotado nível de significância de 5% em todos os testes. Não houve diferença estatisticamente significativa para IRS, IPSD, IPRT, IRSL, ATD e SLR. Houve maior quantidade de cálculo residual nos grupos TC90 (3,66 ± 0,57; mediana

= 4) e AF180 ($3,66 \pm 0,57$; mediana = 4), enquanto que o grupo AC90 ($1,33 \pm 0,57$; mediana = 1) mostrou quantidade significativamente menor de cálculo residual. Encontrou-se uma adesão significativamente maior de células FGH-1, no grupo EDTA180 ($170 \pm 77,99$) no período de 24 horas, e maior efeito proliferativo (48 horas) no grupo TC90 ($172,90 \pm 65,38$). Para células FLP-1, observou-se uma adesão significativamente maior no grupo ACTC90 ($74,67 \pm 98,84$) no período de 24 horas e maior efeito proliferativo (48 horas) no grupo AC90 ($173,8 \pm 139,6$). A partir dos resultados obtidos, sugere-se que a substância a ser utilizada para o condicionamento das superfícies radiculares seja escolhida de acordo com os objetivos do tratamento periodontal: quando se objetiva a formação de nova inserção conjuntiva o uso do EDTA ou AF por 180s ou da tetraciclina por 90s; para regeneração dos tecidos periodontais, sugere-se o uso de AC por 90s.

Palavras-chave: Descontaminação. Raiz dentária. Fibroblastos.

ABSTRACT

Effects of conditioning with different solutions and times on decontamination of root surfaces, adhesion and proliferation of human gingival and periodontal fibroblasts: a study in scanning electron microscopy

The aim of this study was to evaluate *in vitro* the influence of root surface conditioning on adhesion and proliferation of gingival and periodontal ligament fibroblasts on human root fragments of teeth extracted for periodontal reasons. Fragments received scaling and root planning (SRP), and were then randomly allocated into groups according to the substance used for root surface treatment (n= 15/grupo): phosphoric acid 37% applied for 90s (PA90) or 180s (PA180); EDTA 24% applied for 90s (EDTA90) or 180s (EDTA180); 10% citric acid pH 1.0 applied for 90s (CA90) or 180s (CA180); 10% citric acid pH 1.0 associated to tetracycline HCL 50% applied for 90s (CATC90) or 180s (CATC180); tetracycline hydrochloride (50mg/ml) applied for 90s (TC90) or 180s (TC180). Control group was composed by SRP treated root fragments, followed by saline solution washing. After treatment completion, specimens (n=3/grupo) were prepared for scanning electronmicroscopy (SEM) analysis, aiming at evaluation of its surfaces according to the following indexes: superficial roughness (SR); residual calculus (RC); loss of tooth substance (LT); tissue residual (TS), *smear layer* removal (SLR), dentin tubules opening (DTO) and *smear layer* residual (SLR) in photomicrographs on 500x and 1000x magnifications. In 6 specimens of each group 10⁴ gingival fibroblasts (HGF-1) were plated; and over another 6 specimens, 10⁴ periodontal ligament fibroblasts (PLF-1). After MEV evaluation, the number of cells adhered to the root surfaces over 24h and 48h were assessed by a calibrated examiner in triplicates. Groups comparison were analyzed through Kruskal-Wallis post-test Dunn for comparisons for non-linear variables, and ANOVA post-test Tuckey for linear variables. Comparison between pairs over 24 and 48 hours was accessed through Kruskal-Wallis post-test Dunn for non-linear variables, and ANOVA post-test Sidak for linear variables. Significance level of 5% was adopted in all tests. There was no statistical difference for SR, LT, TS, SLR, DTO and SLR. Although there was higher amounts of residual calculus on groups TC90 (3,66 ± 0,57; median = 4) and FA180 (3,66 ± 0,57; median = 4) while group CA90 (1,33 ± 0,57; median = 1) showed statistically less residual calculus. A singnificantlly higher HGF-1

cell count was found on EDTA180 ($170 \pm 77,99$) on 24-hour period and a higher proliferative effect (48 hours) on group TTC90 ($172,90 \pm 65,38$). A significantly higher cell adhesion for (PLF-1) was found on group ACTC90 ($74,67 \pm 98,84$) at 24-hour assessment, and higher proliferative effect (48 hours) for AC90 ($173,8 \pm 139,6$). From the data here exposed, it is suggested that the substance election for root surface conditioning should be based on the treatment primary goal: when a new connective tissue adhesion is aimed, EDTA or PA for 180s or TTC for 90s should be chosen; on the other hand, for periodontal regeneration, CA for 90s should be the best option.

Key words: Decontamination. Tooth root. Fibroblasts.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Seccionamento do dente na altura da junção cimento-esmalte, para separação da coroa e da raiz.....54
- Figura 2** - Seccionamento da raiz no sentido do longo-eixo do dente, separando-o em duas metades correspondentes às faces proximais mesial e distal54
- Figura 3** - Corte horizontal realizado de 5 a 7 mm apicalmente à junção cimento-esmalte, proporcionando a obtenção dos fragmentos radiculares a serem utilizados nos experimentos.....54
- Figura 4** - Contagem do número de células aderidas. Imagem de fotografia de MEV sobreposta com quadrado central de 14cm², utilizada para contagem do número de células nos períodos de 24 e 48 horas.....63
- Figura 5** - Demarcação artificial da área ocupada por células. As células foram coloridas com a ferramenta pincel do programa Adobe Photoshop, visando a determinação mais precisa da área ocupada por células ..64
- Figura 6** - Gráfico ilustrativo do IRS observado nos diferentes grupos (média $\pm$ desvio-padrão), em fotomicrografias de MEV em aumento de 500x (n= 3/grupo).....69
- Figura 7** - Gráfico ilustrativo do ICR observado nos diferentes grupos (média $\pm$ desvio-padrão), em fotomicrografias de MEV em aumento de 500x (n= 3/grupo).....70
- Figura 8** - Gráfico ilustrativo do IPSD observado nos diferentes grupos (média $\pm$ desvio-padrão), em fotomicrografias de MEV em aumento de 500x (n= 3/grupo).....71

Figura 9 - Gráfico ilustrativo do IPRT observado nos diferentes grupos (média $\pm$ desvio-padrão), em fotomicrografias de MEV em aumento de 500x (n= 3/grupo).....	72
Figura 10 - Gráfico ilustrativo do IRSL observado nos diferentes grupos (média $\pm$ desvio-padrão), em fotomicrografias de MEV em aumento de 1000x (n= 3/grupo).....	73
Figura 11 - Gráfico ilustrativo do ATD observado nos diferentes grupos (média $\pm$ desvio-padrão), em fotomicrografias de MEV em aumento de 1000x (n= 3/grupo).....	74
Figura 12 - Gráfico ilustrativo do SLR observado nos diferentes grupos (média $\pm$ desvio-padrão), em fotomicrografias de MEV em aumento de 1000x (n= 3/grupo).....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Índice de rugosidade superficial (IRS).....	60
Tabela 2	- Índice de cálculo superficial (ICS)	60
Tabela 3	- Índice de perda de substância dental (IPSD).....	61
Tabela 4	- Índice da presença de restos teciduais (IPRT).....	61
Tabela 5	- Índice de remoção da <i>smear layer</i> (IRSL).....	62
Tabela 6	- Abertura dos túbulos dentinários (ATD)	62
Tabela 7	- <i>Smear layer</i> remanescente (SLR).....	62
Tabela 8	- Índice de Adesão Celular (IAC).....	65
Tabela 9	- Número de células FGH-1 aderidas às superfícies de cimento após tratamento com as diferentes substâncias por 90 e 180 segundos (média $\pm$ desvio-padrão) nos períodos de 24 e 48 horas	76
Tabela 10	- Número de células FLP-1 aderidas às superfícies de cimento após tratamento com as diferentes substâncias por 90 e 180 segundos (média $\pm$ desvio-padrão) nos períodos de 24 e 48 horas	77
Tabela 11	- Porcentagem de área ocupada pelas células FGH nos períodos de 24 e 48 horas de observação, após o tratamento de superfície com as diferentes substâncias (média $\pm$ desvio-padrão)	79

Tabela 12 - Porcentagem de área ocupada pelas células FLP nos períodos de 24 e 48 horas de observação, após o tratamento de superfície com as diferentes substâncias (média $\pm$ desvio-padrão)	80
Tabela 13 - Índice de adesão celular – FGH-1 nos períodos de 24 e 48 horas de observação, após o tratamento de superfície com as diferentes substâncias (mediana; 95% CI)	81
Tabela 14 - Índice de adesão celular – FLP-1 nos períodos de 24 e 48 horas de observação, após o tratamento de superfície com as diferentes substâncias (mediana; 95% CI)	82
Tabela 15 - Análise da morfologia celular – FGH-1 nos períodos de 24 e 48 horas de observação, após o tratamento de superfície com as diferentes substâncias (mediana; 95% CI)	84
Tabela 16 - Análise da morfologia celular – FLP-1 nos períodos de 24 e 48 horas de observação, após o tratamento de superfície com as diferentes substâncias (mediana; 95% CI)	85

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1	A DOENÇA PERIODONTAL.....	23
2.2	O PERIODONTO.....	23
2.3	REGENERAÇÃO PERIODONTAL	26
2.4	BIOMODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE RADICULAR	29
2.5	BIOMODIFICADORES RADICULARES	33
3	PROPOSIÇÃO.....	49
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.1	OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS RADICULARES	53
4.2	GRUPOS DE TRATAMENTO.....	54
4.3	CULTURA PRIMÁRIA DE FIBROBLASTOS GENGIVAIS (FGH – 1).....	55
4.4	CULTURA PRIMÁRIA DE FIBROBLASTOS DE LIGAMENTO PERIODONTAL (FLP – 1)	57
4.5	ENSAIO DE ADESÃO E PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	58
4.6	AVALIAÇÃO DA DESCONTAMINAÇÃO RADICULAR	59
4.7	PARÂMETROS DA ANÁLISE DA DESCONTAMINAÇÃO RADICULAR.....	59
4.8	ANÁLISE DA ADESÃO E PROLIFERAÇÃO CELULAR SOBRE OS FRAGMENTOS RADICULARES	63
4.9	ANÁLISE DE ADESÃO CELULAR (IAC)	65
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	65
5	RESULTADOS	69
6	DISCUSSÃO.....	89
7	CONCLUSÕES.....	101
	REFERÊNCIAS	105
	APÊNDICES	121

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal leva à destruição das estruturas periodontais de suporte devido ao acúmulo de placa bacteriana e cálculo próximo ao epitélio juncional. Idealmente, o tratamento dos defeitos deixados pela doença periodontal deve buscar a eliminação da inflamação e permitir a restituição do aparato de inserção através da formação de nova inserção, apresentando como consequência, a diminuição na probabilidade de recorrência da doença (MEYER JR, 1986).

Uma vez exposto ao processo de inflamação periodontal e exposição à bolsa periodontal e à cavidade bucal, o cimento sofre alterações estruturais e na sua composição orgânica e inorgânica, incluindo perda de colágeno e prejuízo às fibras dentogengivais. O cimento alterado é poroso e permite a permeação de substâncias orgânicas derivadas da saliva ou placa, bem como íons inorgânicos. A penetração das substâncias é facilitada ainda pela ocorrência de minifaturas e “cracks”, que se desenvolvem frequentemente no cimento exposto (BOSSHARDT e SELVIG, 1997).

Além destas alterações, o cimento contaminado apresenta grânulos patológicos de lipídeos e sacarídeos, conhecidos como grânulos patológicos de Bass, que se estendem de 3 a 12 µm no cimento (BASS, 1951; ARMITAGE e CHRISTIE, 1973). A invasão bacteriana no cimento e na dentina radicular é um achado comum na doença periodontal crônica (DALY et al. 1982). Amostras bacterianas puderam ser cultivadas a partir de amostras de dentina e cimento obtidos de 87% dos dentes extraídos por razões periodontais, sugerindo que cimento e dentina poderiam servir como reservatório para recolonização bacteriana das superfícies radiculares (ADRIAENS et al. 1998). Endotoxinas bacterianas podem ser detectadas de 40 a 70 µm de profundidade a partir da superfície do cimento, embora a união entre as endotoxinas e o cimento seja frágil, podendo ser facilmente removida (ALEO et al. 1974, 1975). A presença de uma camada hipermineralizada de cimento após a exposição ao meio ambiente é outra alteração importante do cimento contaminado, que dificulta ou impede a adesão de fibras de tecido conjuntivo (BOSSHARDT e SELVIG 1997).

O tratamento da doença periodontal depende essencialmente da eliminação de placa e cálculo, bem como na obtenção de superfície radicular biologicamente compatível à inserção de fibras (PITARU e MELCHER 1987; RYLANDER e LINDHE 1999). Apesar da raspagem e alisamento radicular serem

métodos não-cirúrgicos eficazes no tratamento da periodontite, não são capazes de remover por completo o cálculo e bactérias presentes na superfície contaminada (MEYER JR, 1986, NINCI & BOSSHARDT, 2006; ADRIAENS; ADRIAENS, 2004).

Após a instrumentação da superfície radicular, forma-se uma camada de “smear layer” sobre a dentina (PASHLEY 1984), que pode prejudicar a reinserção de fibras colágenas (POLSON et al., 1984) e favorecer o crescimento epitelial ao longo de sua superfície (BEERTSEN et al., 1997; BOSSHARDT; SELVIG, 1997). Essa camada de indutos consiste de material orgânico e inorgânico acumulado após a remoção do cimento e apenas pode ser removida por soluções desmineralizantes (POLSON et al., 1984).

A biomodificação química da superfície radicular foi proposta por Register (1973) e Register e Burdick (1975), baseado nos princípios de desmineralização do tecido ósseo descritos por Urist et al. (1965), a qual expõe proteínas presentes na matriz orgânica do tecido ósseo, levando à regeneração tecidual. Tem como principal objetivo a exposição da matriz colágena da dentina a fim de promover a formação de nova inserção (SUSIN; WIKESJÖ, 2013). A aplicação de substâncias ácidas ou quelantes não apenas expõe camada fibrilar de matriz colágena, mas também remove a *smear layer* e aumenta o diâmetro dos túbulos dentinário (POLSON et al., 1984; RUGGERI JR et al., 2007), favorece a formação de cimento (NINCI & BOSSHARDT, 2006) e a adesão de proteínas do plasma e do coágulo à superfície (WIKESJÖ, 1995), além de promover a migração e orientação de fibroblastos (ZAMAN et al., 2000).

Algumas alternativas de tratamento foram direcionadas à modificação da superfície radicular, em sua maioria com a intenção de aumentar ou devolver sua biocompatibilidade na tentativa de favorecer a regeneração do aparato de inserção periodontal (BEERTSEN et al., 1997; SUSIN; WIKESJÖ, 2013). No entanto, efeitos adversos do condicionamento foram descritos na literatura, incluindo remoção de matriz orgânica, com modificação da estrutura do cimento e da dentina (BLOMLÖF, LINDSKOG 1995), necrose tecidual e retardo no processo de cura das feridas (BLOMLÖF, LINDSKOG 1995), necrose pulpar e abscesso em animais (RYAN et al. 1984) e reabsorção radicular externa em seres humanos (CIZZA, MIGUES 2010; NE et al. 1999; CURY et al. 2005; CARNIO et al. 2002).

Esses efeitos negativos poderiam ser minimizados pela aplicação das soluções por período reduzido de tempo. Assim, nosso grupo de pesquisa recentemente investigo os efeitos do tratamento de superfícies radiculares com

diferentes soluções aplicadas por 3 minutos (método convencional) ou 90 segundos (BARROS 2013). Os resultados obtidos demonstraram que os espécimes tratados apenas por raspagem apresentaram maior quantidade de cálculo, remanescentes teciduais e smear layer residual, além de maior rugosidade superficial. Amostras tratadas por ácido fosfórico e tetraciclina mostraram superfícies com maior quantidade de cálculo residual do que os espécimes tratados por meio de ácido cítrico, EDTA e ácido cítrico associado à tetraciclina nos períodos de 90 e 180 segundos. EDTA e ácido cítrico apresentaram menor quantidade de remanescentes teciduais, seguido do ácido cítrico associado a tetraciclina, sem diferenças significantes entre as aplicações por 90 e 180 segundos. Resultados similares foram observados para o índice de remoção da smear layer. No entanto, nenhuma substância apresentou diferenças estatisticamente significantes na comparação entre 90 e 180 segundos de aplicação, sugerindo que a diminuição no tempo de aplicação das soluções condicionantes não prejudica a propriedade de descontaminação da superfície radicular. Clinicamente, o tratamento de superfícies radiculares com ácido cítrico associado à tetraciclina quando aplicado por 90 ou 180 segundos favoreceu significativamente ($p < 0.050$) a redução da recessão e o aumento na faixa de gengiva ceratinizada em recessões de Miller classes I ou II comparativamente ao grupo controle.

Esses resultados são extremamente significativos, visto que revisão sistemática recentemente realizada por nosso grupo de pesquisa (KARAM et al. 2015) concluiu que nenhum agente de condicionamento da superfície radicular, incluindo ácido cítrico, EDTA, PRP, laser e EMD, mostraram benefícios clínicos significantes nos resultados do tratamento de recessões gengivais por meio de enxerto de tecido conjuntivo subepitelial. Além disso, os achados da pesquisa são opostos a outros relatos de literatura que sugerem que o tratamento químico das superfícies radiculares não traz benefícios clínicos adicionais ao recobrimento radicular (CAFFESSE et al. 2000; KASSAB et al. 2006; BITTENCOURT et al. 2007; CHENG et al. 2007; OLIVEIRA, MUNCINELLI 2012; ZANDIM et al. 2013).

Considerando-se que diferentes resultados foram encontrados em estudos independentes realizados por nosso grupo de pesquisa (AMARAL et al. 2011; BARROS 2013) e em diversos outros estudos (REGISTER, BÜRDÇIK 1975, 1976; CRIGGER et al. 1983; LASHO et al. 1983; BOGLE et al. 1983; POLSON et al. 1984; STERRET et al. 1989; HANES et al. 1991; LABAHN et al. 1992; WEN et al. 1992;

TROMBELLI et al. 1994; BLOMLÖF, LINDSKOG 1995; BLÖMLOF et al. 1995; BLOMLÖF 1996, ISIK et al. 2000; BATISTA et al. 2005; THEODORO et al. 2010; FONTANARI et al. 2011; ABED et al. 2013; CHALAL et al. 2014) e, ainda, considerando-se que o processo de reparo das feridas cirúrgicas depende da adesão e proliferação de células sobre as superfícies dentárias para síntese de matriz orgânica, é necessário investigar melhor as propriedades de diferentes soluções na desmineralização e descontaminação da superfície radicular, resultando em exposição de fibras colágenas, favorecendo a adesão de células fibroblásticas e a formação de nova inserção.

Ainda, levando-se em consideração que o cimento modula a regeneração dos tecidos periodontais e que, portanto, deve ser preservado durante as terapias não cirúrgicas e cirúrgicas periodontais (GONÇALVES et al. 2006) e que a natureza do substrato influencia a adesão e proliferação celular (BOYAN et al. 2003), o objetivo desse estudo é investigar os efeitos da descontaminação de fragmentos radiculares com diferentes substâncias na adesão e proliferação de fibroblastos gengivais e de ligamento periodontal humanos.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A doença periodontal

As doenças crônicas são um problema crescente na população global. Dentre as doenças da cavidade oral, a doença periodontal é a segunda maior contribuinte para esta situação, com taxas de prevalência elevadas em todo o mundo (PETERSEN PE, BAEHNI PC, 2012). Cerca de 10 a 15% da população mundial adulta é afetada pela doença periodontal avançada, apresentando bolsas periodontais ($\geq 6\text{mm}$) e perda de inserção (PETERSEN PE, OGAWA H, 2005). Tal condição pode levar à perda dentária e consequentemente acarretar em má qualidade de vida.

A doença periodontal leva à destruição das estruturas periodontais de suporte decorrente do acúmulo de placa bacteriana e cálculo próximo ao epitélio juncional. Este evento pode acarretar na formação de bolsas periodontais através da migração apical do epitélio ao longo da superfície radicular. Com a progressão da doença, os microrganismos presentes na bolsa se estendem apicalmente ao longo da superfície dentária causando destruição da inserção e dos fibroblastos presentes no ligamento. Além disso, a superfície radicular se torna hipermineralizada e repleta de endotoxinas, de forma que a dentina e o cimento contaminados se tornam um reservatório bacteriano (MEYER, 1986; NANJI, BOSSHARDT, 2006; ADRIAENS, ADRIAENS, 2004).

2.2 O periodonto

O periodonto é um complexo órgão, que une o dente ao osso dos maxilares e atua como uma estrutura de constante adaptação às forças submetidas durante função mecânica (MELCHER, 1976). Em conjunto, o tecido gengival, o ligamento periodontal, cimento e osso alveolar, compõem o periodonto e fornecem sustentação e proteção ao dente (MEYER JR, 1986). Cada um dos componentes periodontais apresenta suas próprias estruturas especializadas e juntos, com suas características individuais, definem função, realizada através da integridade estrutural e interação entre seus componentes (NANJI A & BOSSHARDT DD, 2006).

A junção dentogengival é a parte da mucosa oral que compreende os componentes epitelial e conjuntivo. O epitélio juncional apresenta um papel muito

importante na manutenção da integridade do periodonto, uma vez que sela os tecidos periodontais do ambiente oral. O tecido conjuntivo adjacente ao epitélio juncional se apresenta estruturalmente diferente daquele que suporta o epitélio gengival (NANCI A & BOSSHARDT DD, 2006). As principais fibras do ligamento periodontal se encontram embebidas no osso alveolar de um lado, e em cimento na outra extremidade (BOSSHARDT; SELVIG, 1997).

O processo alveolar é a parte do osso que contém o alvéolo, e de forma geral, apresenta eventos de formação e regulatórios como os de ossos em outros sítios anatômicos. No entanto apresenta uma taxa de *turnover* muito alta, e, na ausência de um dente, se perde; demonstrando que os tecidos periodontais funcionam em conjunto, como uma unidade (NANCI; BOSSHARDT, 2006).

O cimento é um tecido conjuntivo duro, avascular, que recobre a superfície radicular e serve primariamente para envolver e unir as principais fibras do ligamento periodontal (BOSSHARDT; SELVIG, 1997; NANCI; BOSSHARDT, 2006). Em dentes completamente formados e em função, sua união à dentina radicular é muito firme e recobre a superfície radicular inteira (BOSSHARDT; SELVIG, 1997). Esta união com a dentina se dá pela mineralização das fibras de ambos os tecidos simultaneamente durante sua formação, de maneira que eles se tornam uma estrutura única (NANCI; BOSSHARDT, 2006), sendo considerado um componente estrutural do dente. No entanto sua função é principalmente focada na manutenção do aparato de inserção, ancorando as principais fibras do ligamento periodontal à superfície radicular (BOSSHARDT; SELVIG, 1997).

Sua constituição contém cerca de 50% de hidroxiapatita, sendo o restante composto por colágeno e proteínas não colágenas. Este tecido se apresenta subdividido em duas formas principais: o cimento acelular, responsável pela fixação do dente; e o cimento celular, que apresenta um papel adaptativo às forças oclusais e de movimentação do dente, estando também associado ao reparo dos tecidos periodontais (NANCI, 2013). A matriz colágena é constituída principalmente por colágenos do tipo I (em sua maioria) e III (BOSSHARDT; SELVIG, 1997), e este substrato assim como seus subprodutos, apresentam potencial quimiotáticos para leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e fibroblastos (FRANTZ; POLSON, 1988).

O ligamento periodontal é uma faixa de tecido fibroso presente entre o cimento e a parede interna do alvéolo (SOMERMAN et al., 1998). Além de ligar o dente ao osso alveolar propriamente dito, apresenta também funções de proteção e

fornecimento sensorial ao sistema mastigatório, além de funcionar como um reservatório de células responsáveis pela homeostasia e reparo ou regeneração. Em estado de saúde, apresenta diversas populações celulares, incluindo fibroblastos, células endoteliais, restos epiteliais de Malassez, células sensoriais, células ósseas e cementoblastos (BEERTSEN et al.,1997; BOSSHARDT, SELVIG, 1997; NANJI, BOSSHARDT, 2006).

A alta taxa de *turnover* atribui ao ligamento grande facilidade de adaptação a mudanças de condições locais (BEERTSEN et al.,1997; BOSSHARDT, SELVIG, 1997; NANJI, BOSSHARDT, 2006). A força desta estrutura pode ser atribuída às fibras, que estão inseridas no cimento, também nomeadas Fibras de Sharpey (MEYER JR, 1986, BEERTSEN et al.,1997). Sua espessura varia de 0.15 a 0.38mm (NANJI, BOSSHARDT, 2006).

Os fibroblastos são células de fenótipo alongado e fusiforme, ou estrelado com prolongamentos citoplasmáticos, orientados mais ou menos paralelos às fibras colágenas e se apresentam em predominância, com um volume de aproximadamente 25% da densidade células (em humanos). As funções migratórias e contráteis dos fibroblastos são fundamentais nos processos de desenvolvimento e na cicatrização de feridas. No entanto ainda não se sabe ao certo como as células direcionam estas atividades e quais sinalizadores são importantes (SOMERMAN et al., 1998; BEERTSEN et al.,1997; SANT'ANA et al., 2002; PALIOTO et al., 2002; NANJI, BOSSHARDT, 2006).

Os fibroblastos do ligamento periodontal são caracterizados por uma alta taxa de *turnover* do compartimento extracelular, particularmente do colágeno. Esta característica faz com que qualquer interferência na função da célula devido à doença, leve à perda dos tecidos de suporte muito rapidamente. Algumas características destas células ajudam a distingui-las de células de outros tecidos conjuntivos do corpo humano, inclusive de fibroblastos gengivais, como a rica atividade de fosfatase alcalina, que tem um papel fundamental no processo de mineralização e, provável, na formação do cimento acelular, expressão de colágeno tipo XII, formação de nódulos mineralizados *in vivo*, maior produção proteica, dentre outras. Estas atividades sozinhas não são específicas de ligamento periodontal, porém quando estão presentes em conjunto apresentam atributos funcionais fundamentais para a regeneração (SOMERMAN et al., 1998; BEERTSEN W et al.,1997; SANT'ANA et al., 2002; PALIOTO et al., 2002; NANJI A & BOSSHARDT DD, 2006). Quando

apropriadamente induzidos, apresentam a capacidade de sintetizar ligamento periodontal, cemento e osso (MACNEIL; SOMERMAN, 1999).

O ligamento periodontal é um tecido conjuntivo único, que não pode ser repostado por células que não sejam aquelas com origem no ligamento periodontal propriamente dito (BOYKO et al., 1981; BEERTSEN et al., 1997; SANT'ANA et al., 2007). Contribui com células que atuam não somente no seu próprio reparo, mas também na restauração de cemento e osso (NANCI; BOSSHARDT, 2006) uma vez que apresentam células mesenquimais indiferenciadas, que através de estímulos específicos, são capazes de se diferenciar em osteoblastos, cementoblastos e fibroblastos (SANT'ANA et al., 2007). Fibroblastos provenientes do tecido gengival, por sua vez, não induzem regeneração do ligamento periodontal (BOYKO et al., 1981).

Na regeneração periodontal, o ligamento apresenta as seguintes funções: geração de novas fibras e continuidade das fibras do cemento ao osso; prevenção da migração apical do epitélio; contribuição com células que restauram osso e cemento perdido; atua como sensor e ativador biológico na regulação de sua própria espessura. Como a regeneração do periodonto requer íntimo contato entre a superfície radicular desnuda e células que possibilitem a regeneração periodontal, é de considerável importância que as células do ligamento periodontal interajam com uma superfície radicular biologicamente aceitável e que não esteja bloqueada por epitélio (BEERTSEN et al., 1997).

2.3 Regeneração periodontal

Um dos principais objetivos da terapia periodontal é o restabelecimento do ligamento fibroso, cemento e osso perdidos como resultado da periodontite e outras doenças periodontais (BEERTSEN et al., 1997). Idealmente, o tratamento dos defeitos periodontais remanescentes deve buscar a eliminação da inflamação e permitir a restituição do aparato de inserção, tendo como consequência, a diminuição na probabilidade de recorrência da doença (MEYER JR, 1986).

O debridamento da superfície radicular é a base do tratamento profissional, que se caracteriza pela remoção do cálculo e acúmulos bacterianos da superfície radicular através de instrumentos com a ponta afiada. No entanto, bolsas profundas favorecem condições anaeróbicas e a consequente colonização por periodontopatógenos; por isso, as terapias cirúrgicas que visam a eliminação de bolsa,

acabam por alterar o ambiente subgengival através da diminuição da profundidade da bolsa (PETERSILKA; EHMKE; FLEMMIG, 2002).

A obtenção de uma superfície descontaminada é essencial para a cicatrização, reparo e regeneração dos tecidos periodontais uma vez que os contaminantes da superfície radicular inibem o crescimento e viabilidade de fibroblastos *in vivo*, e podem impedir nova inserção conjuntiva (POLSON et al., 1986).

Diferentes terapias cirúrgicas regenerativas podem ser utilizadas para o tratamento da doença e restabelecimento do periodonto, como a utilização de enxertos e substitutos ósseos, regeneração tecidual guiada (RTG), além da aplicação de fatores de crescimento e terapias combinadas. Para aumentar as chances de sucesso é importante utilizar uma associação de técnicas, a fim de permitir um ambiente favorável à regeneração a nível celular (KASAJ et al. 2013). Outras alternativas foram direcionadas à modificação da superfície radicular, em sua maioria com a intenção de aumentar ou devolver sua biocompatibilidade na tentativa de favorecer a regeneração (SUSIN; WIKESJÖ, 2013).

Infelizmente, estas terapias não garantem a regeneração do periodonto como um todo. O avanço no estudo da regeneração periodontal é fundamental para obtermos sucesso na repopulação da ferida não apenas por células de tecido gengival ou ósseo, mas também por células do ligamento periodontal estabelecendo uma função adequada dos tecidos formados. No entanto, o resultado clínico obtido ainda é muito imprevisível e a completa regeneração do periodonto ainda é um resultado difícil de se obter (KASAJ et al. 2013).

Dentre as possibilidades de cicatrização do periodonto, podemos atingir o reparo ou a regeneração. Os dois termos diferem no que se diz respeito ao restabelecimento ou não, da estrutura e função inicial exercida pelas células. Quando há cicatrização por reparo, as estruturas são restabelecidas, porém não restauram propriamente a função e estrutura normal (MELCHER, 1976). Já na cicatrização através da regeneração, além de restaurar as estruturas através da inserção das fibras extrínsecas no cemento, incluindo fibras de Sharpey orientadas paralelamente ou obliquamente ao osso neoformado (SUSIN; WIKESJÖ, 2013), a função do periodonto é também restabelecida (MELCHER, 1976) e o complexo dentogengival age como uma barreira à penetração apical de placa (ALBAIR, COBB, KILLOY, 1982; WAERHAUG 1978).

Melcher, em 1976, citou a dificuldade em alcançar a regeneração das

estruturas do periodonto e ao mesmo tempo a importância em restabelece-las, uma vez que é o conjunto destas que permite a continuidade entre o processo alveolar e cemento, além de possuir células que sintetizam e remodelam os tecidos presentes. No entanto, o reparo, e não completo restauro do periodonto, é o resultado mais frequentemente obtido (BEERTSEN et al., 1997).

Sob circunstâncias ideais, o periodonto apresenta potencial regenerador inato. No entanto, a tentativa de obter a regeneração periodontal continua complexa e desafiadora, de modo que a formação dos tecidos periodontais deve ocorrer de maneira simultânea através da cementogênese, osteogênese e formação de ligamento periodontal de forma igual ou parecida ao periodonto saudável (SUSIN; WIKESJÖ, 2013). Uma sequência de eventos é necessária para atingir a regeneração, incluindo a migração e adesão de células à ferida, e síntese de matriz para restaurar as estruturas perdidas (SOMERMAN et al., 1987).

Uma nova inserção conjuntiva pode ser restabelecida sem a formação de cemento e osso, e apesar de ser uma aderência mais firme, não caracteriza regeneração (ALBAIR, COBB, KILLOY, 1982). Pode ser definida como a reunião dos tecidos periodontais moles a uma superfície radicular patologicamente exposta através da criação de uma nova inserção de tecido conjuntivo (COMMON, MCFALL, 1983). Se células do tecido gengival ocupam primeiro a área da ferida periodontal, é provável que não ocorra o aumento do tecido ósseo ou formação de ligamento periodontal e um tecido cicatricial tome o espaço. Isso porque o tecido conjuntivo gengival não apresenta potencial osteogênico (SANT'ANA et al., 2002).

Na ausência de reinserção de fibras, a cicatrização se estabelece através de um epitélio juncional longo (BEERTSEN W et al., 1997) como uma consequência da falha na regeneração da ferida (SUSIN; WIKESJÖ, 2013). Decorrente da alta taxa proliferativa dos fibroblastos gengivais em relação à outras populações celulares da ferida periodontal, é evidente que dentro de poucos dias, a ferida estaria em grande parte recoberta por epitélio (SUSIN; WIKESJÖ, 2013).

Esta aderência epitelial é considerada como a forma de adesão primária após cirurgias periodontais (COMMON, MCFALL, 1983), porém não é uma barreira suficientemente forte para evitar a re-colonização por microrganismos periodontopatogênicos, que podem levar à recorrência de bolsas periodontais (MEYER, 1986). Apesar de apresentar proteção contra reabsorção óssea, o epitélio juncional longo não atua como condutor na regeneração do tecido conjuntivo e

formação de cimento (BEERTSEN W et al., 1997).

A remoção agressiva do cimento contaminado (chegando a remover até tecido dentinário) tem sido questionada, no sentido de ser praticamente impossível remover toda a camada de cimento principalmente nos terços médio e apical, e também, que a remoção de grande parte de cimento e dentina chegaria a enfraquecer a raiz do dente. Além disso, as bactérias e toxinas estão presentes mais profundamente, em túbulos dentinário de dentes tratados mecanicamente (ALBAIR, COBB, KILLOY, 1982; ADRIAENS; ADRIAENS, 2004; ZAMAN et al., 2000) e uma nova inserção pode ser restabelecida sobre superfície de cimento quimicamente tratada (ALBAIR, COBB, KILLOY, 1982).

Em substituição a esta pratica, seria mais adequado uma remoção suave da camada mais superficial do cimento, e a complementação da descontaminação tanto do cimento quanto da dentina através da utilização de substancias ácidas e quelantes (como o ácido cítrico e EDTA) (ADRIAENS; ADRIAENS, 2004; ZAMAN et al., 2000). Para Somerman e colaboradores (1987), a obtenção de uma superfície brilhante através da raspagem pode levar a remoção de cimento e consequente diminuição no potencial de adesão da superfície radicular.

Após a instrumentação da superfície radicular, forma-se uma camada de “smear layer” sobre a dentina, que pode prejudicar a reinserção de fibras colágenas. Essa camada de debris consiste de material orgânico e inorgânico acumulado após a remoção do cimento, e apenas pode ser removida por soluções desmineralizantes (POLSON et al., 1984; RUGGERI JR et al., 2007).

Gonçalves et al. em 2006 demonstraram que o cimento modula a regeneração de defeitos de furca bilaterais de classe III criados em cães e tratados cirurgicamente por meio de raspagem e alisamento radicular com remoção do cimento (A) ou sem remoção do cimento (B) seguido de regeneração tecidual guiada, visto que os sítios onde o cimento foi preservado mostraram formação de maior quantidade de cimento e osso e menor área de tecido mole sobre a raiz do que em sítios onde o cimento foi removido.

2.4 Biomodificação da superfície radicular

As porções da raiz previamente expostas à doença periodontal se tornam depósitos de bactérias, substâncias citotóxicas, acúmulos de tecido orgânico, além de estarem hipermineralizadas (ADRIAENS; ADRIAENS, 2004).

O cimento e a superfície radicular expostos a periodontopatógenos e seus metabólitos apresentam alterações patológicas significantes, e, mesmo após o debridamento ainda favorecem o crescimento epitelial ao longo de sua superfície (BEERTSEN et al., 1997; BOSSHARDT; SELVIG, 1997). O cimento e a dentina radicular de dentes afetados pela doença periodontal apresentam invasão bacteriana chegando a alcançar túbulos dentinários e, mesmo após meticulosa raspagem e manutenção de higiene, ainda se mantêm contaminados (ADRIAENS et al., 1988). Portanto, o tratamento da superfície radicular não visa apenas a remoção de cálculo e bactéria, mas também da porção de cimento contaminada (ADRIAENS; ADRIAENS, 2004).

O cimento sofre alterações tanto na composição quanto na estrutura de seus componentes orgânico e inorgânico; apresentando-se contaminado por bactérias e seus produtos, além de hipermineralizado (BOSSHARDT; SELVIG, 1997; ADRIAENS; ADRIAENS, 2004). Quando periodontalmente contaminado, apresenta atividades como a inibição da proliferação celular e ativação de reabsorção óssea (HADDAD et al., 2004).

Além disso, esta superfície se comporta como um pobre substrato para adesão de proteínas do plasma e adesão do coágulo, fundamental nos estágios iniciais de cicatrização de feridas (WIKESJÖ, 1995; RUGGERI JR et al., 2007). A inserção conjuntiva à superfície radicular é aparentemente dependente de uma sequência cicatricial cronológica, na qual a rede de fibrina precede a inserção das fibras de colágeno nos eventos iniciais da resposta cicatricial (POLSON; PROYE, 1983). A consolidação do coágulo de sangue se estabelece na fase inicial de cicatrização de feridas (2 a 5 dias) assim como a proliferação de células do ligamento periodontal (DICKINSON et al., 2013).

A biomodificação radicular foi proposta como uma terapia que poderia modificar a superfície periodontalmente comprometida, de forma a melhorar o reparo e a regeneração periodontal (HADDAD et al., 2004). Objetiva a exposição da matriz colágena dentinária e desinfecção da superfície, a fim de promover a formação de nova inserção a partir da obtenção de uma superfície mais biocompatível (ADRIAENS; ADRIAENS, 2004; SUSIN; WIKESJÖ, 2013).

A proposta da desmineralização da superfície radicular foi proposta por Register em 1973 e Register e Burdick em 1975, baseado nos resultados obtidos por Urist, em 1965 e 1971, que demonstrou a indução de neoformação óssea por

fragmentos de dentina implantados intramuscular. Com seus trabalhos, foram demonstradas as primeiras evidências histológicas de reinserção periodontal acelerada (com formação de osso e cimento) em superfícies radiculares desmineralizadas.

Posteriormente, em outros trabalhos em animais e dentes extraídos, foi demonstrado que a aplicação de ácido cítrico sobre uma superfície mecanicamente tratada resulta em exposição de fibrilas colágenas, que a reinserção periodontal em dentes com periodontite crônica é biologicamente possível, assim como a formação de cimento e que a taxa de formação de nova inserção é mais rápida do que em outras técnicas previamente propostas (ALBAIR, COBB, KILLOY, 1982; COMMON, MCFALL, 1983).

Durante a formação de nova inserção, a destruição de cristais de apatita são a primeira etapa, seguida pela união da rede de fibrinas expostas com a nova matriz secretada pelos fibroblastos (FRANK, FIORE-DONNO, CIMASONI, 1983). A cementogênese é precedida pela desmineralização radicular; e a desmineralização provocada por substâncias químicas busca facilitar este processo através da mimetização da superfície presente nos eventos biológicos naturais (LASHO, O'LEARY, KAFRAWY, 1983).

A presença de *debris* sobre a superfície radicular, apresenta um obstáculo à cementogênese e íntima adesão de fibroblastos (LASHO, O'LEARY, KAFRAWY, 1983). A aplicação de substâncias ácidas, ou quelantes, não apenas expõe uma camada fibrilar de matriz colágena, mas também remove a *smear layer* e aumenta o diâmetro dos túbulos dentinários (POLSON et al., 1984; RUGGERI JR et al., 2007). Esta superfície limpa, com túbulos mais amplos e fibras colágenas expostas oferece um ambiente mais favorável à adesão de fibroblastos, com uma nova inserção conjuntiva e formação de cimento (LASHO, O'LEARY, KAFRAWY, 1983).

Substancias como o ácido cítrico e a tetraciclina HCL demonstraram efeito bloqueador na adesão de células epiteliais a superfícies radiculares tratadas (TERRANOVA et al., 1986). A migração epitelial, após o reposicionamento de retalhos gengivais em cirurgias periodontais, deve ser prevenida, a fim de que haja espaço para a formação de nova inserção conjuntiva. A rede de fibrinas é fundamental na cicatrização de feridas, se comportando como uma barreira à migração epitelial, além de proporcionar estabilidade entre o retalho e a superfície radicular (WIKESJÖ, 1995). O coágulo de fibrinas é fundamental na facilitação da integração entre a superfície

radicular e o novo tecido conjuntivo, favorecendo a migração e adesão de fibroblastos (RUGGERI JR et al., 2007).

Durante a regeneração periodontal inicial, células progenitoras de cimento devem ser geradas ou recrutadas para a ferida, de forma muito mais rápida do que no desenvolvimento; sendo muito provável que estas células se originem da mesma porção de cimento intacta, presente na raiz (BOSSHARDT; SELVIG, 1997). Alguns fatores de crescimento e proteínas específicos são parte da matriz do cimento, proporcionando informação essencial para o recrutamento, adesão e proliferação de células do periodonto (ZAMAN et al., 2000).

A exposição das fibrilas colágenas da dentina, favorece a formação de cimento (NANCI A & BOSSHARDT DD, 2006). Contudo, a presença de falhas entre a dentina e cimento neoformado encontradas em cortes histológicos de tecidos regenerados, sugerem uma fraca fusão destes tecidos; diferente daquela observada nos processos de desenvolvimento (MACNEIL; SOMERMAN, 1999). Após vários tratamentos regenerativos, a separação entre o cimento neoformado e a superfície quimicamente tratada também é frequentemente observada, demonstrando uma adesão pobre entre os mesmos, e sugerindo que ainda haja espaço para o aperfeiçoamento no procedimento de condicionamento químico de raízes periodontalmente afetadas (NANCI; BOSSHARDT, 2006).

A superfície condicionada se apresenta como um reservatório de fatores de crescimento de liberação lenta, aumentando seu tempo de liberação e, conseqüentemente, sua ação no local (SANT'ANA et al., 2007; KING, COCHRAN, 2002). O condicionamento radicular é também um fator que atua na taxa de formação de osso e cimento pelas BMPs (proteínas morfogenéticas ósseas - componentes da matriz orgânica da superfície radicular), aumentando seu efeito através de uma melhor ligação da proteína à superfície tratada (KING, COCHRAN, 2002).

Os agentes condicionantes radiculares apresentam diversas características que favoreceriam a formação de nova inserção, porém sua efetividade clínica ainda não pode ser confirmada (SANT'ANA et al., 2007. AMARAL et al., 2011; KARAM et al., 2016). Apesar de não haver diferenças clínicas significativas (MARIOTTI, 2003), a natureza da interface entre o tecido gengival e a superfície radicular pode ser substancialmente melhorada após o condicionamento radicular, através do estabelecimento de uma nova inserção conjuntiva e formação de cimento (TROMBELLI, 1998).

Deve-se tomar cuidado ao extrapolar estas afirmações, uma vez que fatores como a falta de controle, examinadores não calibrados, amostras reduzidas, além de grande diferença de protocolos de utilização dos agentes condicionantes, tem influencia na qualidade observacional dos estudos (MARIOTTI, 2003; AMARAL et al., 2011). Revisões sistemáticas que avaliaram a eficácia clínica da regeneração periodontal após a biomodificação radicular, reportam que mais estudos *in vivo* e clínicos randomizados são necessários para prover um resultado estatisticamente significativo (MARIOTTI, 2003; KARAM et al., 2016).

A contaminação da superfície radicular acometida pela doença periodontal por endotoxinas e microbiota periodontopatogênica, dificulta a regeneração ao impedir a migração e proliferação de células do ligamento periodontal ao longo de sua superfície. A fim de permitir a re-população desta superfície por células viáveis, é importante a realização da descontaminação e modificação estrutural da mesma (PITARU, MELCHER, 1987). Considerando a importância dos eventos celulares que ocorrem no processo de regeneração, a biomodificação radicular se encaixa em uma etapa crítica, favorecendo o acontecimento destes eventos. Algumas de suas consequências como o impedimento da migração epitelial sobre a superfície radicular tratada, e o aumento na atuação de fatores de crescimento no local necessitam de mais estudos (KING, COCHRAN, 2002)

2.5 Biomodificadores radiculares

Diversas substâncias têm sido estudadas ao longo dos anos, com a finalidade de obter a demineralização da superfície com a menor perda de substância e maior poder de limpeza da *smear layer* em um menor tempo de ação.

Em 1973, Register avaliou se ocorria nova inserção, cementogênese e osteogênese induzida por raízes desmineralizadas *in vivo*. Nas raízes de 21 dentes de vários animais, a dentina foi cirurgicamente exposta. Utilizando o modelo de boca dividida, a dentina em metade dos dentes foi tratada com HCl durante 15 minutos enquanto que os dentes contralaterais receberam tratamento com solução de soro fisiológico. A análise histológica demonstrou que os dentes tratados com ácido mostraram reinserção de tecido conjuntivo à superfície radicular, com cementogênese e osteogênese aceleradas. Os espécimes controles não mostraram reinserção de tecido conjuntivo, cementogênese incompleta e pouca ou nenhuma osteogênese.

Register e Burdick em 1975 avaliaram a capacidade de vários ácidos em promover a formação de nova inserção conjuntiva, incluindo os ácidos hidrocloreídrico, láctico, fosfórico, tricloroacético e fórmico, observando melhores resultados com o uso de ácido cítrico pH 1.0 por 2-3 minutos, produzindo reinserção do retalho com cementogênese. Introduziram o conceito de demineralização da superfície, com o ácido cítrico pH 1.0 por 2 a 3 minutos, e esta se tornou a substância mais utilizada. A partir de então, diversos trabalhos testaram esta e outras substâncias, sendo as mais amplamente utilizadas além do ácido cítrico, o EDTA 24%, a tetraciclina HCL e o ácido fosfórico (MARIOTTI, 2003; ZAMAN et al., 2000; RUGGERI JR et al., 2007).

Posteriormente, em 1976, por meio de avaliação histológica para avaliar a reinserção periodontal em cães após a utilização de ácido cítrico pH 1.0, REGISTER e BURDICK observaram que os melhores resultados são obtidos com a aplicação por 2 minutos, com a produção de pinos de cimento no interior dos túbulos dentinários alargados pela desmineralização, reinserção de fibras e cementogênese.

Garret et al. em 1978 demonstraram que a aplicação tópica de ácido cítrico à dentina produz uma zona de desmineralização de 4µm de espessura, expondo fibras colágenas da dentina e promovendo a abertura dos túbulos dentinários. Depois, em 1980, Garret et al. demonstraram que o condicionamento de superfícies radiculares tratadas com ácido cítrico pH 1.0 após a raspagem favoreceu a inserção de fibras à superfície radicular por meio de fusão das fibrilas dentinárias expostas ao novo colágeno formado.

Passanezi et al. em 1979 introduziram o tratamento químico radicular com ácido fosfórico a 37% aplicado durante 3 minutos com a proposta de melhor adequar a superfície que seria cirurgicamente recoberta e, assim, aumentar as taxas de sucesso do recobrimento.

A efetividade do condicionamento radicular com ácido cítrico prévio ao reposicionamento coronal do retalho foi avaliada por Liu e Solt (1980) no tratamento de recessões gengivais unitárias. A superfície a ser recoberta foi tratada com ácido cítrico, pH 1.0 por um minuto. A comparação dos dados clínicos pré e pós-operatórios com o grupo controle (sem tratamento de superfície), demonstrou diferenças estatisticamente significantes no ganho de tecido gengival e recobrimento radicular, demonstrando que recessões gengivais podem ser tratadas com sucesso através do retalho reposicionado para coronal, associado ao condicionamento radicular com ácido cítrico (LIU; SOLT, 1980).

Ririe et al. em 1980 demonstraram que a adesão de fibras a superfícies radiculares tratadas por meio de condicionamento ácido foi mediada por interdigitação de fibrilas expostas da dentina desmineralizada com as fibras de tecido conjuntivo gengival depois de 2 semanas e formação de novo cemento depois de 42 dias.

Boyko et al. em 1980 investigaram a adesão de fibroblastos de ligamento periodontal a superfícies radiculares de porcos. Os fragmentos foram desmineralizados com EDTA 0.5m, HCl 0.6n e ácido cítrico por 3 e 60 minutos. Demonstraram maior número de células aderidas às superfícies desmineralizadas, porém sem diferenças entre os ácidos utilizados.

Renvert e Egelberg, em 1981, demonstraram ganho de inserção clínica de 2 mm em sítios tratados por meio de condicionamento ácido radicular comparativamente a 1.2 mm nos sítios não condicionados.

O efeito antibacteriano do ácido cítrico pH 1.0 foi investigado por Daly et al. em 1982 em dentes extraídos, lavados em solução de soro fisiológico e imersos em solução de ácido cítrico por 3 minutos. Bactérias anaeróbias e aeróbias foram cultivadas sobre os fragmentos e observaram que o ácido cítrico inibiu o crescimento bacteriano, provavelmente decorrente do baixo pH, responsável pela degradação de proteínas. Ainda em 1982, Nalbandian e Cote demonstraram que espécimes tratados com ácido cítrico apresentaram maior cementogênese, com aumento em espessura do cemento e tecido conjuntivo.

Em 1982, Albair et al. estudaram a resposta tecidual ao redor de dentes periodontalmente comprometidos tratados com ácido cítrico pH 1.0 por 5 minutos previamente à sua extração. Durante observação em microscópio eletrônico de varredura (MEV), foi observada nova inserção conjuntiva apenas nos dentes tratados quimicamente em comparação ao grupo controle, onde não houve formação de nova inserção em nenhum dos espécimes. Nas análises por MEV, foi constatado que em nenhum dos espécimes que apresentou a nova inserção, esta se dava diretamente à dentina; em contrapartida essa inserção era diretamente sobre cemento remanescente ou neoformado. Em todos os espécimes controle, a adesão de tecido mole se deu através de epitélio juncional longo.

Substâncias químicas como o EDTA (15% por 5min) e ácido cítrico (PH 1.0 por 3min) foram avaliadas por Lasho et al. em 1983 como tratamento superficial de fragmentos radiculares periodontalmente afetados. Uma investigação ultra estrutural através de imagens obtidas em MEV, demonstrou nos espécimes tratados por ácido

cítrico, uma superfície irregular com poucas aberturas tubulares e exposição de algumas fibras colágenas. Já nos espécimes tratados com EDTA, a superfície radicular também se mostrou irregular, e com uma pequena camada de *debris* remanescentes, com poucos túbulos abertos de diâmetro menor do que nos espécimes tratados por ácido cítrico; as numerosas fibras colágenas expostas, apresentavam morfologia alterada. No grupo controle (tratado apenas com solução salina) a superfície era mais irregular, com a presença moderada de *debris*, aberturas de túbulos e exposição de fibrilas colágenas mínimas ou ausentes.

Polson e Proye (1983) demonstraram em um estudo histológico *in vivo* claramente a influencia da natureza da superfície radicular como determinante na obtenção de inserção conjuntiva ou epitélio juncional longo. Em dentes de macacos-esquilo, após extração e debridamento do terço coronal, foi aplicado ácido cítrico pH 1, enxaguados com solução fisiológica e reinseridos em seus alvéolos. Através de cortes histológicos foram avaliados colágeno e fibrina. Nas observações dos períodos de cicatrização inicial da ferida aos 1, 3, 7 e 21 dias, nos espécimes tratados com ácido cítrico, a fibrina estava bem adaptada, e inserida à superfície radicular; enquanto no grupo controle, encontrou-se diversas lacunas entre a rede de fibrinas e a superfície radicular. Ao fim dos 21 dias, nos espécimes tratados, o epitélio ainda estava localizado na JCE, com fibras colágenas inseridas à superfície radicular, porém sem sinais de neoformação de cimento. Os resultados observados neste estudo demonstram que a rede de fibrinas aderida à superfície radicular se mostra como componente fundamental na prevenção da migração epitelial.

Ainda em 1983, Common e McFall estudaram a resposta cicatricial a nível histológico em pacientes submetidos à tratamento para recessão gengival através do retalho reposicionado lateralmente. Em um grupo foi utilizado o ácido cítrico pH1.0 por 2 minutos, e nada no grupo controle. Nos espécimes do grupo controle foi observada cicatrização através da formação de epitélio juncional longo. Em contrapartida, no grupo teste a cicatrização se deu por meio da formação de nova inserção conjuntiva, com organização perpendicular e oblíqua das fibras que se inseriam em cimento. Além disso, apenas nos espécimes tratados houve formação de novo cimento, tanto sobre a superfície de dentina quanto de cimento antigo. Segundo os autores, o ácido cítrico atua através da dissolução dos cristais de hidroxiapatita presentes na porção mineral da matriz do dente.

Estudos *in vitro* conduzidos por Baker et al. (1983) demonstraram a

capacidade da tetraciclina ácida se aderir à superfície radicular e ser posteriormente liberada, propriedade conhecida como substantividade.

Héritier et al. (1984) avaliaram os efeitos da aplicação de solução de ácido fosfórico a 50% por 1, 2 e 3 minutos na morfologia da superfície dentinária, e demonstraram que a aplicação do ácido por 1 minuto produziu camada desmineralizada de 4.5 μm , com exposição das fibrilas colágenas, enquanto que a aplicação por 2 e 3 minutos ampliaram a área desmineralizada, com desaparecimento da estrutura de colágeno, sugerindo que o tempo de 1 minuto é considerado ideal quando se almeja regeneração dos tecidos periodontais.

Em 1986, Polson et al. avaliaram a resposta celular dos tecidos conjuntivo e epitelial sobre superfícies de dentes após a desmineralização com ácido cítrico (pH 1, 3 minutos) e implantação transcutânea no dorso de ratos. Foi com a intenção de esclarecer o papel das características da superfície radicular que os espécimes foram implantados em um tecido conjuntivo que não apresenta células progenitoras do periodonto. Nos espécimes de superfície desmineralizada, observaram grande diferença em relação às superfícies que não obtiveram nenhum tipo de tratamento, uma vez que as primeiras apresentavam uma maior predisposição à adesão de células e fibras além de inibição da migração epitelial. O tratamento com este ácido resultou na desmineralização da superfície dentinária com exposição de matriz colágena, que consiste primariamente em colágeno tipo I. Também apresenta características quimiotáticas estimulantes para leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e fibroblastos.

Polson e Frederick em 1985 demonstraram que várias células se aderiram à superfície de dentina tratada com ácido cítrico por 3 minutos e implantadas no dorso do animal, exibindo processos celulares que se estendiam por longas distâncias na superfície radicular e nos túbulos dentinários. Dando continuidade ao estudo, mostraram em 1986 que, após 1, 3, 5 e 10 dias de implantação, não houve diferenças entre os parâmetros observados para espécimes derivados de dentina externa e de dentina pulpar. Relativamente ao tratamento mostraram que nas superfícies desmineralizadas havia maior número de células, inserção de fibras e inibição da migração apical de células epiteliais.

A tetraciclina, particularmente, tem a vantagem de se aderir à superfície radicular na concentração mínima de 50mg/ml, de onde é lentamente liberada por até 14 dias (Wikesjö et al., 1986; Demirel et al., 1991). Wikesjö et al., em 1986

demonstraram que a tetraciclina ácida aplicada a superfícies radiculares apresentava atividade anti-microbiana em um período de 48 horas, podendo servir como um reservatório de liberação lenta de tetraciclina.

Estudos *in vitro* também demonstraram que ocorre união da tetraciclina à fibronectina, proteína de adesão celular que media a inserção e migração de células mesenquimais. A presença de fibronectina permite maior adesão e colonização celular. Por outro lado, a tetraciclina reverte a adesão de laminina, proteína de adesão de células epiteliais (Terranova et al, 1986). Esses dados são sugestivos de que a tetraciclina favorece a adesão de células fibroblásticas.

A ação desmineralizante da tetraciclina foi testada por Claffey et al. em 1987. Após a criação cirúrgica de defeitos periodontais, as superfícies radiculares foram expostas à cavidade bucal durante 3 meses sem controle de placa. Após este período, os sítios expostos foram tratados com tetraciclina HCl a 1%. Após 6 meses de acompanhamento, os espécimes obtidos mostraram adesão de tecido conjuntivo e maior ganho de inserção do que espécimes tratados com ácido cítrico, como também demonstrado por Ririe, Crigger & Selvig (1987).

Em um estudo realizado em modelo animal, Frantz e Polson (1988) condicionaram fragmentos de dentina com tetraciclina nas concentrações de 100ml/cc e 200ml/cc por 5 minutos, observando nestes uma maior adesão celular em comparação ao grupo controle (solução fisiológica). O estudo abordou a importância das características de superfície na cicatrização, favorecendo a migração e adesão celular nas superfícies tratadas. No entanto, apesar disso, não houve a formação de um aparato de inserção nestas superfícies, o que poderia ser decorrente da liberação lenta da tetraciclina por um tempo prolongado (até 48h após sua aplicação), alterando a função de polimorfonucleares fundamentais na cascata biológica cicatricial e até da síntese de colágeno.

Hanes et al., em 1991, descreveram a ocorrência de inconsistências histológicas na zona de desmineralização superficial da superfície de cimento afetada por doença periodontal após o tratamento com ácido cítrico e a falta de adesão de tecido conjuntivo às superfícies radiculares. Foram examinados espécimes de cimento obtidas de dentes afetados por doença periodontal e saudáveis. O tratamento com ácido cítrico por 3 minutos em raízes saudáveis produziu morfologia ondulada, acentuadamente fibrilar de colágeno. No cimento doente, não houve muita alteração no seu aspecto morfológico, sugerindo que as alterações do cimento

decorrente do processo de doença periodontal reduziu os efeitos da desmineralização, o que pode explicar, ao menos em parte, a falta de inserção conjuntiva após o tratamento ácido observada em alguns estudos

Segundo Codelli et al. em 1991, o tempo ideal de tratamento de superfícies radiculares com ácido cítrico pH 1.0 é de 3 minutos, já que o condicionamento por períodos superiores de tempo (5 minutos) levou a estado de sobre-desmineralização, com desnaturação proteica.

Para Wen et al., em 1992, superfícies radiculares não tratadas por ácido exibem morfologia amorfa e irregular, correspondente à *smear layer*. O tratamento com ácido cítrico por 4 minutos resultou em remoção da *smear layer*, abertura dos túbulos dentinários e exposição de colágeno intertubular nos fragmentos tratados de forma passiva, enquanto que aqueles tratados de forma ativa (esfregaço) não apresentaram superfície homogênea.

A tetraciclina HCL apresenta o mesmo potencial de ligação à superfície de cimento ou dentina. Quando aplicada topicamente, na concentração de 100mg/ml por 3 minutos, apresentou alta substantividade *in vitro* e amplo espectro antimicrobiano, persistindo biologicamente ativa por 14 dias em ambas as superfícies, de acordo com estudo realizado por Demirel, Baer, McNamara, em 1991. Quando utilizada na concentração de 50mg/ml também apresentou substantividade de 14 dias. Os resultados obtidos *in vivo*, suportam o uso da superfície radicular como substrato para liberação lenta de tetraciclina (DEMIREL, BAER, MCNAMARA, 1991).

Em 1992, Labahn et al. avaliaram os efeitos do ácido cítrico e da tetraciclina em solução aplicados passivamente ou na forma de brunimento sobre superfície de dentina e sugeriram que as duas substâncias removeram a *smear layer*, porém com maior ampliação da abertura dos túbulos dentinários promovida pelo ácido cítrico, independentemente da forma de aplicação.

Lafferty et al. em 1993 demonstraram que aplicação de ácido cítrico ou tetraciclina hidrocloreídrica após a raspagem resultou em remoção da *smear layer*, promoveu abertura dos túbulos dentinários e exposição de fibras colágenas, inclusive inter-tubulares. Segundo Stabholz et al. (1993), na concentração de 50 mg/ml, a tetraciclina apresenta substantividade de 14 dias, porém em concentrações menores, como 10mg/ml, a substantividade não chegou a 5 dias. Em relação ao tempo de exposição (1, 3 ou 5 minutos) não houve influência na ação antimicrobiana da substância.

O cimento não exposto à doença periodontal, segundo Chaves et al. em 1993, apresenta estrutura normal, enquanto que aqueles expostos ao processo de doença mostram em sua superfície uma camada de cálculo e bactérias, os quais não são completamente removidos pelo tratamento com ácido cítrico. Ao contrário dos espécimes tratados por meio de raspagem, que demonstraram superfície lisa e regular, com evidência de estrias paralelas correspondentes aos golpes das curetas, porém com *smear layer* obliterando os orifícios de entrada dos túbulos dentinários. O tratamento com ácido cítrico após a raspagem resultou em camada superficial lisa, livre de remanescentes de cálculo ou *smear layer*, com desobliteração dos túbulos dentinários e exposição de fibras colágenas.

Trombelli, Scabbia e Calura avaliaram, em 1994, os efeitos do tratamento de superfícies de cimento e dentina não afetados por doença periodontal com tetraciclina ácida, demonstrando sua capacidade de remoção da camada de *smear-layer* e exposição de substrato de colágeno fibrilar em dentina. Nos espécimes de cimento, a quantidade de exposição da matriz orgânica aparentemente estava mais relacionada a estrutura morfológica do cimento e a instrumentação mecânica da superfície radicular do que ao tempo ou concentração da aplicação da solução de tetraciclina. A exposição de matriz orgânica intertubular estava evidente apenas nos espécimes condicionados por 4 minutos.

Ainda sobre a tetraciclina, em uma análise histológica de tratamento regenerativo em pré-molar humano tratado por meio de condicionamento com tetraciclina 50mg/ml, ativamente, por 3 minutos após debridamento mecânico, seguido de enxerto gengival livre descrita por Pasquinelli em 1995, demonstrou ganho de inserção de 4.4mm e 4mm de formação de novo osso no sítio cirúrgico, após 10 meses e meio de acompanhamento.

O uso do EDTA como agente condicionante foi descrito em 1995 por Blomlöf e Lindskog. Os autores comparam a textura de superfícies dentinárias condicionadas com ácido cítrico, ácido fosfórico e EDTA e sugeriram que o EDTA é uma substância quelante capaz de remover maior conteúdo mineral e expor mais matriz colágena. No ano seguinte, Blomlöf, Blomlöf e Lindskog investigaram a eficácia da aplicação subgengival de gel de EDTA na remoção da *smear layer* e exposição de fibras colágenas de superfícies radiculares após terapia periodontal não cirúrgica, demonstrando que o condicionamento com EDTA promoveu abertura dos túbulos dentinários e exposição de fibras colágenas. Em outro artigo, no mesmo ano, em

estudo realizado em macacos, demonstraram diferenças estatisticamente significantes na cicatrização de defeitos de deiscência experimentais tratados cirurgicamente incluindo o condicionamento com EDTA do que o tratamento sem condicionamento com EDTA. Histologicamente, observaram maior área de inserção (epitélio, tecido conjuntivo e cimento reparativo; 10-15%), menor comprimento do epitélio juncional (20%) e maior inserção de tecido conjuntivo à superfície radicular (20%). Dentes tratados com ácido cítrico (n=14) mostraram aproximadamente 10% maior área de tecido conjuntivo e epitélio juncional 15% mais curto. Esses achados sugeriram que o tratamento de superfícies radiculares com EDTA melhora a cicatrização, impedindo o efeito necrosante superficial em tecidos periodontais expostos ao ácido cítrico.

Em 1997, estes autores demonstraram que a raspagem e alisamento radicular deixa sobre a superfície uma camada de *smear layer* que é eficientemente removida pelo tratamento com EDTA, que ainda foi capaz de expor fibras colágenas em graus variáveis. As concentrações de 1.5% e 5% não foram efetivas na remoção da *smear layer*, mas as concentrações de 15% e 24% foram efetivas tanto na remoção da *smear layer* quanto na exposição de fibras colágenas da dentina. Em 2000, avaliaram os efeitos do gel de EDTA na raspagem sub e supragengival de 91 pacientes, mas não observaram diferenças entre os grupos tratados com EDTA e o grupo controle em relação ao ganho de inserção e redução da profundidade de sondagem. No mesmo ano, avaliaram os efeitos da aplicação de gel de EDTA durante a terapia periodontal cirúrgica em pacientes fumantes e não demonstraram diferenças significantes entre os grupos controle negativo (sem ácido), positivo (ácido cítrico) e teste (EDTA) relativamente ao ganho de inserção ou redução da profundidade de sondagem depois de 3 e 6 meses de acompanhamento. No entanto, em 21 pacientes não fumantes e sem sangramento à sondagem nos períodos de acompanhamento, observaram maior redução da profundidade de sondagem e ganho de inserção após o controle de outras variáveis de influência, como idade, sexo e controle de placa.

Madison e Hockett em 1997 trataram 82 espécimes de dentina com diferentes tipos de tetraciclina, incluindo tetraciclina HCl, doxiciclina, minociclina e sumicina, comparativamente à solução de soro fisiológico durante 0.5, 1, 3, 5 e 10 minutos. A solução mais efetiva na remoção da *smear layer* e descontaminação da superfície radicular foi a tetraciclina HCl, inclusive para o menor tempo avaliado. Ainda em 1997, Sterret et al. demonstraram que a aplicação de tetraciclina hidrocloreídrica na

concentração mínima de 75 mg/ml durante 3 minutos teve efeitos similares a concentrações mais elevadas da substância na desmineralização da dentina.

Também Rompen, Goffinet e Nusgens em 1999 demonstraram que, duas horas após o cultivo, espécimes de dentina tratados com ácido cítrico ou minociclina evidenciavam processos citoplasmáticos dentro dos túbulos dentinários. Depois de 24 horas de incubação, o ácido cítrico promoveu intenso espalhamento de células, enquanto a minociclina induziu a formação de densa camada de processos celulares, com fibroblastos de ligamento periodontal aderidos aos dois tipos de superfície, com maior taxa de proliferação, conteúdo total de proteína e colágeno do que espécimes de dentina não tratados com ácido.

Isik et al. em 2000 trataram 48 amostras de dentina com tetraciclina hidrocloreídica nas concentrações de 0%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 125% e 150% durante 1, 3 ou 5 minutos. Não foram observadas diferenças morfológicas entre os diferentes tempos de aplicação, porém as concentrações mais baixas só são efetivas quando aplicadas por períodos maiores de tempo.

Zaman et al. (2000) avaliaram *in vivo* a migração, adesão e orientação de fibroblastos do ligamento periodontal ao cimento e dentina previamente desmineralizados com soluções de EDTA 24%, ácido cítrico pH 1.2 e tetraciclina HCL 100mg/ml. Após cultura com células FLP, analisou os fragmentos de dente (humano, previamente extraídos por doença periodontal) por meio de microscópio de fase invertido nos períodos de 1, 3 e 7 dias. Não houve diferenças entre a adesão e orientação dos fibroblastos em cimento ou dentina. No entanto, houve maior número de células aderidas à dentina tratada com EDTA e ácido cítrico em relação à dentina não tratada, e também nos fragmentos de cimento dos três grupos tratados em relação ao não tratado. Concluiu-se que a desmineralização através do EDTA ou ácido cítrico aumentam a adesão e orientação de fibroblastos à superfície dentinária, e a remoção de cimento excessiva não é necessária.

Haddad et al. 2004 estudaram o efeito inflamatório do cimento contaminado e tratado com tetraciclina HCL inserido em câmeras subcutâneas de ratos. Os resultados deste estudo *in vivo*, demonstraram que o cimento periodontalmente contaminado apresenta ação inflamatória local intensa, enfatizando a importância do debridamento a superfície radicular no tratamento periodontal. A tetraciclina HCL (50mg/ml) quando utilizada por 5 minutos em cimento contaminado, apresentou aumento dos níveis de TNF- α e IFN- γ , demonstrando uma ação

moduladora pró-inflamatória no tecido. Este resultado supostamente se deu por meio da ação de excesso de tetraciclina adsorvida no cimento, ou até mesmo remanescente após o enxague decorrente do alto tempo de exposição (5min). Os autores sugeriram que a tetraciclina pode apresentar efeitos benéficos na remoção de toxinas da superfície radicular, porém, no tecido circundante acaba levando a uma inflamação indesejada.

Scelza et al. em 2004 demonstraram que as soluções de ácido cítrico e EDTA quando aplicadas por 3 minutos foram mais efetivas na abertura de maior número de túbulos dentinários, embora nenhuma substância fosse capaz de remover completamente a *smear layer* em canais radiculares. Além disso, demonstraram que o uso das substâncias por períodos maiores do que 3 minutos pode resultar em saturação das soluções no interior dos túbulos dentinários e obliteração da abertura dos túbulos dentinários.

De acordo com Gamal e Mailhot em 2007 o condicionamento de superfícies radiculares com gel de EDTA a 24% foi efetivo na remoção da *smear layer*, comparável àquele observado quando substâncias de baixo pH foram utilizadas, sendo mais eficaz na exposição das fibras colágenas.

Através de análise imunohistoquímica de superfícies tratadas com ácido cítrico 10% (2min) e EDTA 17% (2min), RUGGERI JR et al. em 2007 encontraram grande marcação para fibrilas colágenas e proteoglicanas para o primeiro grupo, e uma menor marcação para a segunda substância. Os grupos controle, que sofreram apenas raspagem e alisamento radicular ou ultrassom, apresentaram *smear layer* residual sem marcações para colágeno e proteoglicanas. Apesar do efeito desmineralizante e remoção da *smear layer*, tanto o ácido cítrico quanto o EDTA foram capazes de preservar as propriedades da matriz dentinária exposta pela biomodificação da superfície, sugerindo seu uso em processos regenerativos periodontais.

Em 2007, Sant'Ana e colaboradores analisaram os efeitos de diferentes fatores de crescimento (TGF- β 1, PDGF-BB e IGF-1) na adesão e proliferação in vitro de células do ligamento periodontal sobre superfícies radiculares tratadas apenas com raspagem e alisamento radicular ou associadas a uma solução de ácido cítrico e tetraciclina. Os resultados obtidos demonstraram aumento no número de células aderidas aos fragmentos nos grupos tratados com raspagem e alisamento radicular associado à biomodificação radicular com tetraciclina a 50% associada ao ácido cítrico

pH 1.0 por 3 minutos em relação ao grupo tratado apenas pela instrumentação radicular, com diferenças estatisticamente significantes entre os mesmos.

Shetty, Dinesh e Seshan (2008) trataram 80 espécimes de dentina com tetraciclina hidrocloreídrica, minociclina, doxiciclina e ácido cítrico por 5 minutos e observaram que todos os agentes foram capazes de remover quase completamente a *smear layer*, com maior abertura dos túbulos dentinários promovida pela tetraciclina hidrocloreídrica.

Leite et al. em 2010 demonstraram que o tratamento de superfícies radiculares com ácido cítrico a 25% resultou na formação de rede de fibrina densa aderida às superfícies, seguido do tratamento com EDTA a 24% e tetraciclina a 50mg/ml, sendo que as duas últimas substâncias não demonstraram diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle, sugerindo que a biomodificação com ácido cítrico possibilita adesão do coágulo à superfície radicular.

Amaral et al. em 2011 analisaram a ação de quatro agentes desmineralizantes (ácido cítrico líquido 50% pH1, Tetraciclina HCL 50mg/ml, EDTA 24% e ácido fosfórico 37%) aplicados de forma ativa por 3 minutos para o tratamento de fragmentos radiculares periodontalmente comprometidos e previamente raspado. Por meio de análise em MEV, observou-se *smear layer* recobrimdo 100% da superfície dos espécimes dos grupos controle (apenas soro fisiológico por 3min) e ácido fosfórico, 80% do grupo EDTA, 33,3% do grupo tetraciclina HCL e 0% do grupo tratado com ácido cítrico. O grupo tratado com ácido cítrico apresentou diferença estatisticamente significativa de todos os grupos, com exceção da tetraciclina HCL. Estabeleceu-se então, uma ordem decrescente de efetividade destas substâncias em relação aos parâmetros analisados, sendo ela: AC>TC-HCL>EDTA>AF.

Fontanari et al., ainda em 2011, demonstraram que o condicionamento radicular com diferentes agentes apresenta resultados divergentes na literatura, o que poderia ser atribuído a vários fatores, incluindo hipermineralização da superfície radicular, conforme investigado em microscopia eletrônica de varredura.

Belal et al. em 2012 avaliaram os efeitos do condicionamento radicular com EDTA a 24% e aplicação de PDGF na adesão e proliferação de fibroblastos de ligamento periodontal. Todos os grupos (não tratado, tratado por raspagem apenas, EDTA 24%, PDGF apenas e EDTA 24% + PDGF) mostraram aumento significativo do número de células aderidas do exame inicial aos 7 dias, sendo maior nos grupos EDTA, PDGF e EDTA+PDGF. No entanto, o tratamento mais efetivo foi o

condicionamento com EDTA apenas.

Kasaj et al. (2013) demonstraram aumento na densidade de fibroblastos do ligamento periodontal humano sobre superfícies radiculares tratadas com EDTA 24% (2min) em relação às tratadas apenas mecanicamente por raspagem e alisamento radicular. As células se mostraram bem adaptadas à superfície, com longos processos citoplasmáticos sugerindo que a desmineralização com EDTA promoveu colonização inicial e formação de tecido subsequente através da obtenção de uma superfície mais biocompatível.

Em 2013, Abed et al. demonstraram que amostras de dentina tratadas por meio de detergente (MTAD) por 3 minutos pela técnica ativa (esfregaço) resultou em maior largura dos túbulos dentinários abertos, seguido por ácido cítrico e tetraciclina ácida.

No mesmo ano, Barros demonstrou que fragmentos de cimento tratados apenas por raspagem demonstraram os maiores índices de rugosidade superficial e remoção da *smear layer*, enquanto o grupo tratado por EDTA durante 180 segundos demonstrou os menores índices de cálculo residual, perda de substância dental, presença de restos teciduais e maior remoção de *smear layer*, porém sem diferenças significantes em relação aos grupos tratados por EDTA por 90 segundos, ácido cítrico e ácido cítrico associado à tetraciclina por 90 e 180 segundos.

Em estudo *in vivo*, Caba-Paulino em 2014 avaliou a influência da aplicação de ácido cítrico pH1.0 em diferentes concentrações (10% e 50%) por diferentes tempos (90, 120 e 180 segundos) sobre fragmentos de dentes humanos periodontalmente comprometidos, e previamente raspados. Seus resultados indicaram que o tempo de aplicação e a concentração da solução de ácido cítrico influenciaram o comportamento das células de ligamento periodontal, porém não a capacidade de remoção da *smear layer* e aumento do diâmetro dos túbulos dentinários. Dentre as concentrações e tempos de aplicação utilizados, o ácido cítrico a 10% com aplicação de 90s foi o que apresentou uma superfície mais favorável à proliferação de fibroblastos de ligamento periodontal humano

Chalal et al. em 2014 demonstraram que condicionamento ácido radicular com ácido cítrico, tetraciclina e doxiciclina com bolinhas de algodão de forma passiva por 5 minutos foram efetivas para remoção da *smear layer*, desobliteração e alargamento dos túbulos dentinários, além de exposição de matriz colágena, sendo a tetraciclina HCl considerada como o melhor agente.

Ainda outras substâncias ácidas foram testadas, como em um estudo no qual o azul de toluidina O, agente químico empregado na terapia fotodinâmica, foi testado como possível agente desmineralizante. Apesar de demonstrar bons efeitos na desmineralização da superfície (decorrente de seu pH ácido), quando comparado ao ácido cítrico com tetraciclina, apresentou efeitos inferiores na proliferação celular de fibroblastos gengivais (DAMANTE et al., 2016).

3 Proposição

3. PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral

O objetivo primário do presente estudo é investigar, *in vitro*, a influência do tratamento de superfícies radiculares por diferentes substâncias e tempos de aplicação na adesão e proliferação de fibroblastos gengivais e de ligamento periodontal humanos a fragmentos radiculares obtidos de dentes extraídos por razões periodontais.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do estudo são:

- Investigar os efeitos dos diferentes agentes químicos na descontaminação da superfície de cimento quando aplicados por 90 e 180 segundos por meio de microscopia eletrônica de varredura;
- Investigar o número de fibroblastos gengivais e de ligamento periodontal aderidos às superfícies radiculares após o tratamento com as soluções por 90 e 180 segundos após 24 e 48 horas de cultivo, determinando suas taxas de adesão e proliferação, respectivamente;
- Investigar a área ocupada por fibroblastos gengivais e de ligamento periodontal humanos após os diferentes tipos de tratamento nos períodos de 24 e 48 horas;
- Determinar o índice de adesão celular nos diferentes grupos de tratamento após os períodos de 24 e 48 horas;
- Investigar a morfologia das células aderidas aos fragmentos radiculares após os diferentes tratamentos após os períodos de 24 e 48 horas.

The background of the page is a light gray marbled paper with a complex, organic pattern of swirling, vein-like shapes. The pattern is dense and covers the entire surface, creating a textured, aged appearance.

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOB-USP (CAAE 45955615.0.0000.5417). Previamente à realização dos experimentos, os participantes foram informados verbalmente e por escrito quanto aos objetivos da pesquisa, seus riscos e benefícios. Foram incluídos no estudo aqueles que voluntariamente concordaram com a doação de parte do tecido gengival ou dos dentes extraídos, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.1 Obtenção dos fragmentos radiculares

A coleta dos dentes extraídos foi realizada na Clínica II (Periodontia e Cirurgia) da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FOB-USP.

Para preparo das amostras, foram coletados 83 dentes extraídos por razões periodontais. Os dentes foram limpos, após a extração, com gaze esterilizada embebida em soro fisiológico para remoção dos remanescentes teciduais. Remanescentes visíveis de cálculo foram removidos por meio de raspagem com curetas manuais. Procedeu-se ao armazenamento dos dentes em um recipiente contendo solução de soro fisiológico, o qual foi mantido refrigerado até a realização dos experimentos.

Todos os dentes foram submetidos, como forma de padronização, a procedimento de raspagem e alisamento radicular com curetas Gracey previamente à obtenção dos fragmentos radiculares. Para isso, os dentes foram apreendidos pela coroa e submetidos a 20 golpes de curetas no sentido ápico-coronal. As curetas foram afiadas com pedra de Arkansas após o tratamento de cada um dos dentes da amostra, preservando-se o corte adequado do instrumento (JUSTO 2003).

A coroa dos dentes foi então separada da raiz com broca diamantada tronco-cônica em alta rotação, sob refrigeração constante e abundante, na altura da junção cimento-esmalte (Figura 1). A raiz foi seccionada em seu longo-eixo (Figura 2), separando o dente em duas porções, correspondentes às faces proximais mesial e distal. Um terceiro corte foi realizado horizontalmente, de 5 a 7 mm apicalmente à borda cervical dos fragmentos (Figura 3). Foram obtidos 166 fragmentos radiculares,

os quais foram aleatoriamente alocados em um dos grupos de tratamento, descritos a seguir.

Figura 1- Seccionamento do dente na altura da junção cimento-esmalte, para separação da coroa e da raiz; **Figura 2-** Seccionamento da raiz no sentido do longo-eixo do dente, separando-o em duas metades correspondentes às faces proximais mesial e distal; **Figura 3-** Corte horizontal realizado de 5 a 7 mm apicalmente à junção cimento-esmalte, proporcionando a obtenção dos fragmentos radiculares a serem utilizados nos experimentos (BARROS, 2013)

4.2 Grupos de tratamento

Os fragmentos obtidos foram divididos em 11 grupos de acordo com o tratamento químico das superfícies:

- **AC90** – aplicação de solução de ácido cítrico pH 1.0 a 10% (Gel manipulado por Bauru Fórmulas, Bauru/SP) por 90 segundos; seguido de lavagem abundante com soro fisiológico, pela técnica passiva (n=15);
- **AC180** – aplicação de solução de ácido cítrico pH 1.0 a 10% (Gel manipulado por Bauru Fórmulas, Bauru/SP) associado à tetraciclina a 50% por 180 segundos, seguido de lavagem abundante com soro fisiológico, pela técnica passiva (n=15);
- **ACTC90** – aplicação de solução de ácido cítrico pH 1.0 a 10% associado à tetraciclina a 50% (Gel manipulado por Bauru Fórmulas, Bauru/SP) por 90 segundos, seguido de lavagem abundante com soro fisiológico, pela técnica passiva (n=15);
- **ACTC180** – aplicação de ácido cítrico pH 1.0 a 10% associado à tetraciclina 50% (Gel manipulado por Bauru Fórmulas, Bauru/SP) por 180 segundos; seguido de lavagem abundante com soro fisiológico, pela técnica passiva (n=15);

- **TC90** – aplicação de solução de tetraciclina hidrocloreídrica 50mg/ml (1 cápsula de Tetraciclina Hidrocloreídrica 500mg diluída em 10ml de soro fisiológico estéril) por 90 segundos, seguido de lavagem abundante com soro fisiológico, pela técnica passiva (n=15);
- **TC180** – aplicação de tetraciclina hidrocloreídrica 50mg/ml (1 cápsula de Tetraciclina Hidrocloreídrica 500mg diluída em 10ml de soro fisiológico estéril) por 180 segundos; seguido de lavagem abundante com soro fisiológico, pela técnica passiva (n=15);
- **EDTA90** – aplicação de solução de EDTA a 24% (Gel manipulado por Bauru Fórmulas, Bauru/SP) por 90 segundos, seguido de lavagem abundante com soro fisiológico, pela técnica passiva (n=15);
- **EDTA180** – aplicação de solução de EDTA a 24% (Gel manipulado por Bauru Fórmulas, Bauru/SP) por 180 segundos, seguido de lavagem abundante com soro fisiológico, pela técnica passiva (n=15);
- **AF90**– aplicação de ácido fosfórico a 37% (Dentsply Sirona, Brasil) por 90 segundos, seguido de lavagem abundante com soro fisiológico, pela técnica passiva (n=15);
- **AF180**– aplicação de ácido fosfórico a 37% (Dentsply Sirona, Brasil) por 180 segundos, seguido de lavagem abundante com soro fisiológico, pela técnica passiva (n=15);
- **Controle**– lavagem abundante com soro fisiológico (n=16).

Três espécimes de cada grupo foram preparados para análise em microscopia eletrônica de varredura para avaliação dos parâmetros de descontaminação da superfície radicular. Os demais espécimes de cada grupo foram destinados ao cultivo de células, para avaliação da adesão e proliferação celular nos períodos de 24 (n=6) e 48 (n=6) horas após o plaqueamento celular, conforme descrito posteriormente.

4.3 Cultura primária de fibroblastos gengivais (FGH-1)

Para o estabelecimento de cultura primária de fibroblastos gengivais (FGH-1), foram obtidas biópsias gengivais de dois pacientes, sem distinção de sexo ou raça, saudáveis sistemicamente, não fumantes e não usuários de medicamentos de uso contínuo, como bloqueadores de canais de cálcio, cortisona, ciclosporina ou outros, em

tratamento nas clínicas de Periodontia e Integrada Reabilitadora II da Faculdade de Odontologia de Bauru- USP. O tecido necessário ao estabelecimento de cultura primária de fibroblastos gengivais foi obtido através da excisão de uma parte de tecido gengival coletado durante procedimento cirúrgico periodontal de recobrimento radicular por meio da técnica de enxerto gengival livre e aumento de coroa clínica por meio de gengivectomia.

Imediatamente após sua remoção os tecidos foram armazenados em tubos Falcon contendo 10ml de meio de transporte (DMEM 20% SFB, 2% ATB 1% ATM) e levados ao laboratório de cultura de células do Centro Integrado de Pesquisa I para estabelecimento da cultura primária. A separação celular foi realizada por meio do processo mecânico-enzimático.

No laboratório de cultivo celular, dentro da capela de fluxo laminar, os fragmentos foram removidos do falcon, e passados rapidamente em álcool 70% para descontaminação. Logo em seguida, em uma placa de Petri contendo solução tampão fosfato salina (PBS) e 2% de solução antibiótica-antimicótica, foram cuidadosamente dissecados com o auxílio de lâminas de bisturi para início da separação mecânica, até que estivessem partidos em pedaços miúdos. Este processo foi repetido mais 3 vezes, em placas de Petri distintas, contendo PBS e 2% de solução antibiótica-antimicótica, de forma a eliminar ao máximo possíveis remanescentes sanguíneos e contaminação proveniente da cavidade oral.

O conteúdo da quarta placa de Petri, foi colocado em um tubo falcon, no qual foi adicionada tripsina. Os fragmentos teciduais permaneceram imersos em tripsina a 37°C por 5 minutos, sendo depois centrifugados. O processo foi repetido uma vez, e o precipitado celular resultante suspenso em 1ml de meio de cultura DMEM (DMEM, Cultilab, Campinas, Brasil) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab) e 2% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA). Logo em seguida, o conteúdo foi acondicionado em garrafas para cultivo celular (25cm²) em ambiente com atmosfera húmida, 5% de dióxido de carbono (CO₂), a 37°C.

O crescimento celular foi monitorado diariamente em microscópio de fase invertido. Assim que surgiram as primeiras células, 1 ml de meio de cultura foi adicionado a cada 2 dias até atingir 5ml. Depois disso, o meio foi trocado até que o crescimento se apresente como monocamada subconfluente (70%-80% da área cultivável recoberta por células). Quando as células foram destacadas por métodos enzimáticos (solução de

tripsina-Cro 25%, EDTA 1mM em PBSA) e cultivadas em frascos progressivamente maiores até atingirem número suficiente para a realização dos experimentos.

Todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar, seguindo os protocolos de manutenção e esterilidade de materiais e soluções utilizadas (Freshney, 2010), no Centro Integrado de Pesquisas-I da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP.

4.4 Cultura primária de fibroblastos de ligamento periodontal (FLP-1)

A cultura primária de fibroblastos de ligamento periodontal humano foi estabelecida a partir da remoção de ligamento periodontal de 3^{os} molares sem indícios de perda óssea ou inserção periodontal. A obtenção da linhagem celular do ligamento periodontal será baseada no método de cultura primária descrito previamente por Somerman et al. (1988). Os dentes extraídos contendo os remanescentes teciduais de ligamento periodontal, foram imediatamente colocados em tubos falcon contendo DMEM, 200 U/ml de penicilina G potássica, 200 mg/ml de sulfato de estreptomicina e 20 µg/ml de anfotericina B e transportados ao laboratório do Centro Integrado de Pesquisas-I da FOB-USP para estabelecimento da cultura primária.

Os dentes foram removidos do falcon, e colocados em placas de Petri contendo solução tampão fosfato salina sem cálcio e sem magnésio (PBSA), lavados e dissecados finamente com 2 lâminas de bisturi número 15. A fim de evitar a contaminação da cultura por fibroblastos gengivais ou de polpa, apenas o terço médio das raízes foi, cuidadosamente, raspado. Os fragmentos teciduais obtidos foram posicionados em frascos de cultura de 25 cm² contendo DMEM, soro fetal bovino (FBS) a 10% e solução antibiótica-antimicótica a 2%, em pH 7.4. Os frascos foram em seguida levados à estufa de cultura de tecidos, contendo atmosfera úmida composta de 95% de ar e 5% CO₂, à temperatura de 37° C. Fragmentos menores foram colocados em tubos Falcon contendo 10 ml de PBSA e centrifugados por 3 minutos. Após esse procedimento o PBSA foi aspirado, e o precipitado celular ressuspensionado em 1 ml de DMEM contendo FBS 10% e solução antibiótica-antimicótica 2%, sendo então transferidos para frascos de cultura de 25 cm² e levados à estufa.

Durante a primeira semana, 1 ml de meio de cultura foi acrescentado ao frasco a cada dia, até completar 5 ml. O meio de cultura passou a ser, a partir de então, substituído a cada 2 dias até que as células atingissem subconfluência (70-80% da área cultivável recoberta por células). Nesse momento, as células foram destacadas dos frascos por

métodos enzimáticos (solução de tripsina-Cro 25%, EDTA 1 mM em PBSA) e transferidas para frascos progressivamente maiores até que houvesse número suficiente de células para a realização dos experimentos. Todos os procedimentos de cultivo celular foram realizados de acordo com a proposta de Freshney (2014), no Centro Integrado de Pesquisas-I da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP.

4.5 Ensaio de adesão e proliferação celular

Os fragmentos radiculares obtidos foram posicionados em placas de 12 poços, com a superfície tratada voltada externamente. Sobre os fragmentos, foram cultivadas 1×10^4 células fibroblásticas derivadas de gengiva (FGH-1) e de ligamento periodontal (FLP-1) em DMEM suplementado com FBS 10% e solução antibiótica-antimicótica. Para cada grupo e período, foram utilizados 6 fragmentos dentários, sendo 3 fragmentos cultivados com células FGH-1 e outros 3 fragmentos cultivados com células FLP-1. As células foram cultivadas por períodos de 24 e 48 horas após o plaqueamento em estufa de atmosfera úmida, contendo 95% ar e 5% CO₂, à temperatura de 37° C.

Após esse período, o meio de cultura foi removido e as amostras preparadas. Para as amostras que não receberam células (n=3 por grupo), logo após o tratamento das superfícies e lavagem abundante com soro, as amostras foram novamente esterilizadas. Em seguida, secas com papel absorvente, e depois em ar condicionado *overnight*. Após desidratação em álcool absoluto por 2 minutos e nova secagem com papel absorvente, os fragmentos foram colados com esmalte de unha em base metálica circular (“stubs”) de aproximadamente 1cm de diâmetro. As amostras foram então acondicionadas em sílica para receberem a metalização e leitura posteriormente.

Nas amostras que receberam plaqueamento celular, o preparo foi baseado na metodologia utilizada por Frias (2014). Após remoção do meio, foi realizada a fixação com solução de *Karnovsky* por 2 horas, seguido de duas lavagens em tampão cacodilato 0,1M por 15 minutos cada. Depois, os fragmentos foram submersos em tetróxido de ósmio a 2% em tampão cacodilato, por mais duas horas. Após remoção do tetróxido de ósmio, as amostras foram desidratadas em soluções de etanol crescentes até álcool absoluto por 2 minutos. Seguidos de nova secagem ao ar, os fragmentos foram colados com esmalte de unha em *stubs* de aproximadamente 1cm de diâmetro. Após a colagem, as amostras foram acondicionadas em sílica para receberem a metalização e leitura posteriormente.

Todos os fragmentos foram colocados em aparelho “*Sputer-Coating*” para impregnação superficial com fina camada de ouro necessária à leitura em MEV. Em seguida, os fragmentos preparados foram levados ao microscópio eletrônico (JEOL JSM-6610 SEM) para leituras em aumentos de 500x e 1000x, utilizando-se as porções centrais dos fragmentos para leitura principal. Após a seleção dos campos para leitura, os fragmentos foram fotografados as imagens digitais utilizadas para análise dos parâmetros de descontaminação, conforme posteriormente descrito.

4.6 Avaliação da descontaminação da superfície radicular

As imagens digitalizadas dos fragmentos receberam um código, impedindo sua identificação por examinador independente, experiente e previamente calibrado. A calibração foi realizada com 10 imagens aleatoriamente escolhidas, as quais foram analisadas em três períodos de tempo, com intervalos de 7 dias entre os mesmos. A concordância entre as análises foi investigada por meio do teste Kappa para os parâmetros de descontaminação de superfície (Índice da Presença de Restos Teciduais – IPRT; $k = 0.738$; $p < 0.001$; Apêndice G) e para a contagem de células no período de 24 horas ($k = 1.0$; $p < 0.001$; Apêndice H).

4.7 Parâmetros de análise da descontaminação radicular

Os efeitos do tratamento mecânico e químico da superfície radicular foram avaliados de acordo com a metodologia empregada por BARROS (2013), com o objetivo de investigar as características de superfície dos espécimes tratados e de validar a proposta de associação dos índices utilizados para avaliação da descontaminação da superfície radicular:

Rugosidade superficial

A rugosidade superficial dos fragmentos após os diferentes tratamentos foi analisada nas fotomicrografias em aumento de 500x, de acordo com o índice de rugosidade superficial (IRS) (LIE; MEYER, 1977; MEYER; LIE, 1977):

Tabela 1- Índice de rugosidade superficial (IRS)

Escore	Parâmetros de avaliação
1	Superfícies lisas e uniformes ou ligeiramente rugosas, sem sinais de instrumentação
2	Maioria das áreas ligeiramente rugosas, com algumas regiões onduladas, mas sem marcas óbvias do instrumento usado
3	Áreas definitivamente onduladas e algumas marcas do instrumento intermeadas a áreas relativamente uniformes
4	Superfícies definitivamente onduladas e com marcas da instrumentação abrangendo a maioria da área

Cálculo residual

A presença de cálculo residual foi identificada nas fotomicrografias em aumento de 500x, de acordo com o índice de cálculo residual (ICR) (LIE; MEYER,1977; MEYER; LIE, 1977):

Tabela 2 - Índice de cálculo residual (ICR)

Escore	Parâmetros de Avaliação
1	Nenhum cálculo remanescente na superfície radicular
2	Pequenas manchas de material estranho, provavelmente consistindo de cálculo
3	Manchas definidas de cálculo confinadas a áreas menores
4	Quantidades consideráveis de cálculo remanescente, aparecendo como uma ou mais manchas volumosas ou como várias manchas menores distribuídas sobre a superfície tratada

Perda de substância dental

A perda de substância dental foi avaliada em fotomicrografias de 500x de aumento, de acordo com o índice da perda de substância dental (IPSD) (LIE; MEYER,1977; MEYER; LIE, 1977):

Tabela 3 – Índice da perda de substância dental (IPSD)

Escore	Parâmetros de Avaliação
1	Nenhuma perda detectável de substância dental
2	Ligeira perda de substância dental limitada a áreas localizadas, estando a maioria do cimento intacta
3	Perda definida de substância dental na maior parte da superfície tratada, porém sem marcas profundas do instrumento na dentina, podendo ocorrer ausência de cimento em algumas áreas
4	Perda considerável de substância dental, com marcas profundas do instrumento na dentina, com remoção da maioria do cimento

Presença de restos teciduais

A capacidade de descontaminação das superfícies radiculares foi investigada em fotomicrografias em aumento de 500x, de acordo com o índice da presença de restos teciduais (IPRT) (HÜLSMANN et al. 1997):

Tabela 4 – Índice da presença de restos teciduais (IPRT)

Escore	Parâmetros de Avaliação
1	Superfície radicular limpa, contendo poucas e pequenas partículas de remanescentes teciduais
2	Superfície radicular contendo várias pequenas partículas de remanescentes teciduais
3	Superfície radicular contendo várias partículas de remanescentes teciduais cobrindo menos de 50% da área
4	Mais de 50% da superfície radicular coberta com remanescentes teciduais
5	Superfície radicular completamente ou quase completamente coberta com remanescentes teciduais

Remoção da ‘smear layer’

A capacidade de descontaminação das superfícies radiculares foi investigada em fotomicrografias em aumento de 1000x, de acordo com o índice de remoção da smear layer (IRSL), adaptado da proposta de Hülsmann et al. (1997):

Tabela 5 - Índice de remoção da smear layer (IRSL)

Escore	Parâmetros de avaliação
1	Ausência de <i>smear layer</i> , com desobliteração dos túbulos dentinários
2	Pequena quantidade de <i>smear layer</i> , com desobliteração de alguns túbulos dentinários
3	Camada homogênea de <i>smear layer</i> cobrindo a superfície, com poucos túbulos desobliterados
4	Camada homogênea de <i>smear layer</i> , sem desobliteração dos túbulos
5	Camada homogênea e densa de <i>smear layer</i> cobrindo a superfície dentinária

Além desses parâmetros, foram propostos dois novos métodos de avaliação das imagens de MEV em aumento de 1000x, baseados na presença ou ausência de túbulos abertos na superfície do cimento e na presença ou ausência de smear layer remanescente, conforme descrito nas Tabelas 6 e 7:

Tabela 6 – Abertura dos túbulos dentinários (ATD)

Escore	Parâmetros de avaliação
1	Presença de túbulos dentinários abertos
2	Presença de pequena quantidade de túbulos evidentes, com diâmetro pequeno ou com obliteração de superfície
3	Ausência de túbulos abertos

Tabela 7 – Smear layer remanescente (SLR)

Escore	Parâmetros de avaliação
1	Ausente
2	Pequena quantidade (< 50%)
3	Grande quantidade (> 50%)
4	Densa quantidade (dupla camada)

4.8 Análise da adesão e proliferação celular sobre os fragmentos radiculares

Para determinação do número de células FGH-1 e FLP-1 aderidas à superfície dos fragmentos radiculares, foram obtidas fotomicrografias de MEV nos aumentos de 500x e 1000x, da área central dos fragmentos. As fotomicrografias digitais obtidas foram codificadas, impedindo sua identificação pelo examinador. As imagens foram inseridas em slides no programa *Power Point* (Microsoft Office); sobre as mesmas, foi desenhado um quadrado central de 14cm², o qual foi subdividido em 4 quadrantes. O número de células aderidas foi contado em cada quadrante, conforme ilustrado pela Figura 4, para determinação do número total de células aderidas aos fragmentos nos períodos de 24 (adesão) e 48 (proliferação) horas.

Figura 4 – Contagem do número de células aderidas. Imagem de fotografia de MEV sobreposta com quadrado central de 14cm², utilizada para contagem do número de células nos períodos de 24 e 48 horas

A área ocupada pelas células foi determinada por meio do programa de análise de imagens ImageJ (NIH, EUA). Para tanto, a área total de cada fragmento foi determinada por meio das ferramentas do programa, assim como a área ocupada pelas células. Para facilitar a identificação da área ocupada por células, estas foram destacadas em colorido com a ferramenta pincel do programa Photoshop (Adobe), como exemplificado na Figura 5.

Figura 5 – Demarcação artificial da área ocupada por células. As células foram coloridas com a ferramenta pincel do programa Adobe Photoshop, visando a determinação mais precisa da área ocupada por células

O percentual ocupado pelas células foi determinado pela fórmula:

$$\% \text{ Área celular} = \frac{\text{área ocupada pelas células}}{\text{área total do fragmento}} \times 100$$

Após a determinação da área ocupada pelas células, foi determinado para cada fragmento o Índice de Adesão Celular (MARTINEZ 2015), conforme descrito na Tabela 8:

Tabela 8- Índice de Adesão Celular (IAC)

Escore	Características
0	Ausência de células
1	Menos de 25% da superfície recoberta por células
2	25 - 49,99% da superfície recoberta por células
3	De 50% a 74,99% da superfície recoberta por células
4	De 75 a 99,99% da superfície recoberta por células
5	100% da superfície recoberta por células e presença de 2ª camada celular

4.9 Análise da morfologia celular

A morfologia das células aderidas à superfície radicular foi determinada por meio dos critérios adaptados de Gamal e Mailhot (2000):

- Escore 1 – células achatadas (bem aderidas), apresentando prolongamentos celulares
- Escore 2 – combinação de células achatadas, ovais e arredondadas
- Escore 3 – predomínio de células ovais
- Escore 4 – predomínio de células arredondadas (pouco aderidas), sem prolongamentos celulares
- Escore 5 – células ausentes

4.10 Análise estatística

Os dados obtidos foram estatisticamente analisados no programa GraphPad Prism 7.0 para Mac. Foi realizada análise estatística descritiva para todos os parâmetros investigados (índices de rugosidade superficial, cálculo residual, perda de substância dentária, presença de restos teciduais e remoção de *smear layer*, abertura dos túbulos, *smear layer* residual, número e percentual de células aderidas). A comparação entre os grupos foi realizada pelo método Kruskal-Wallis complementado

pelo teste de Dunn para variáveis não lineares, e por meio de análise de variância múltipla (ANOVA) complementado pelo teste de Tukey para as variáveis lineares. A comparação entre os pares nos períodos de 24 e 48 horas foi realizada por meio do método ANOVA pós-teste Sidak para variáveis lineares e Kruskal Wallis pós-teste Dunn para variáveis não lineares. Em todas as análises, foi adotado nível de significância de 5% ($\alpha = 0.05$).

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Descontaminação da superfície radicular

Índice de rugosidade superficial (IRS)

A análise realizada pelo teste de Kruskal-Wallis não demonstrou diferenças estatisticamente significantes ($p= 0.932$) entre os grupos, conforme demonstrado na Figura 6. A maior rugosidade superficial foi observada no grupo AF90 ($2,33 \pm 1,52$; mediana= 2) e as menores rugosidades superficiais foram observadas nos grupos TC90 e SF180 ($1,00 \pm 0,0$; mediana= 1).

Figura 6- Gráfico ilustrativo do IRS observado nos diferentes grupos (média $\pm$ desvio-padrão), em fotomicrografias de MEV em aumento de 500x ($n= 3$ /grupo)

Índice de cálculo residual (ICR)

Relativamente ao ICR, a análise pelo método de Kruskal-Wallis demonstrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p = 0.04$). Houve maior quantidade de cálculo residual nos grupos TC90 ($3,66 \pm 0,57$; mediana = 4) e TC180 ($3,66 \pm 0,57$; mediana = 4). O grupo AC90 demonstrou a menor quantidade de cálculo residual ($1,33 \pm 0,57$; mediana = 1), conforme ilustrado na Figura 7.

Figura 7- Gráfico ilustrativo do ICR observado nos diferentes grupos (média $\pm$ desvio-padrão), em fotomicrografias de MEV em aumento de 500x ($n = 3/\text{grupo}$)

Índice de perda de substância dentária (IPSD)

Não houve diferenças significantes entre os grupos em relação ao IPSD ($p=0,64$; Kruskal-Wallis). O maior IPSD foi observado nos grupos AC90 ($2,00 \pm 1,73$) e AF90 ($2,00 \pm 1,73$), conforme ilustrado na Figura 8.

Figura 8- Gráfico ilustrativo do IPSD observado nos diferentes grupos (média $\pm$ desvio-padrão), em fotomicrografias de MEV em aumento de 500x ($n= 3/\text{grupo}$)

Índice da presença de restos teciduais (IPRT)

Não houve diferenças significantes entre os grupos em relação ao IPRT ($p=0,08$; Kruskal-Wallis). Nenhum grupo se apresentou livre de remanescentes teciduais, conforme ilustrado na Figura 9. O grupo TC180 apresentou o maior IPRT ($4,00 \pm 1,00$; mediana = 4), enquanto os grupos AC90 e EDTA180 apresentaram os menores IPRT ($1,33 \pm 0,57$; mediana = 1).

Figura 9- Gráfico ilustrativo do IPRT observado nos diferentes grupos (média $\pm$ desvio-padrão), em fotomicrografias de MEV em aumento de 500x ($n= 3$ /grupo)

Índice de remoção da *smear layer* (IRSL)

Não houve diferenças significantes entre os grupos em relação ao IRSL ($p=0,21$; Kruskal-Wallis). Nenhum grupo se apresentou livre de *smear layer* e com desobliteração dos túbulos dentinários, conforme ilustrado na Figura 10. De forma geral, o melhor resultado foi observado no grupo ACTC90 ($2,33 \pm 1,15$; mediana= 3) e o pior resultado no grupo ACTC180 ($4,66 \pm 0,57$; mediana = 5).

Figura 10- Gráfico ilustrativo do IRSL observado nos diferentes grupos (média $\pm$ desvio-padrão), em fotomicrografias de MEV em aumento de 1000x ($n=3$ /grupo)

Abertura dos túbulos dentinários (ATD)

Não houve diferenças significantes entre os grupos em relação à ATD ($p=0,64$; Kruskal-Wallis). A maioria dos espécimes apresentou nenhuma ou desobliteração parcial de poucos túbulos dentinários, conforme ilustrado na Figura 11, com bastante similaridade entre os grupos.

Figura 11- Gráfico ilustrativo do ATD observado nos diferentes grupos (média $\pm$ desvio-padrão), em fotomicrografias de MEV em aumento de 1000x ($n=3$ /grupo)

Smear layer remanescente (SLR)

Não houve diferenças significantes entre os grupos em relação à SLR ($p=0,05$; Kruskal-Wallis). A maioria dos espécimes apresentou remoção apenas parcial de smear layer, conforme ilustrado na Figura 12. O pior resultado foi apresentado pelo grupo AF180 ($4,00 \pm 0,00$ mediana = 4).

Figura 12 - Gráfico ilustrativo do SLR observado nos diferentes grupos (média $\pm$ desvio-padrão), em fotomicrografias de MEV em aumento de 1000x ($n=3$ /grupo)

5.2 Ensaio de adesão e proliferação celular

Número de células aderidas

Foram observadas diferenças estatisticamente significantes no número de células FGH-1 (média das contagens em triplicatas) aderidas aos fragmentos dentários tratados pelos diferentes ácidos e períodos de aplicação, conforme análise por ANOVA pós-teste Tukey ($p<0,0001$), conforme ilustrado na Tabela 9.

Tabela 9 – Número de células FGH-1 aderidas às superfícies de cimento após tratamento com as diferentes substâncias por 90 e 180 segundos (média $\pm$ desvio-padrão) nos períodos de 24 e 48 horas

Período: 24 horas (p< 0.001; ANOVA pós-teste Tukey)		
Agente condicionador	Tempo de aplicação	
	90 seg	180 seg
AC	63,11 $\pm$ 22,8 ^{a NS *}	21,11 $\pm$ 23,88 ^{a †}
ACTC	46,22 $\pm$ 22,83 ^{a NS ‡}	75,11 $\pm$ 42,73 ^{b Δ}
TC	67,89 $\pm$ 37,79 ^{a NS •}	52,33 $\pm$ 11,84 ^{a,b □}
EDTA	24,11 $\pm$ 22,76 ^{a S °}	170 $\pm$ 77,99 ^{c ♦}
AF	35,33 $\pm$ 33,06 ^{a NS #}	12,78 $\pm$ 6,92 ^{a ♠}
SF	18,56 $\pm$ 13,34 ^{a NS +}	38,56 $\pm$ 16,28 ^{a,b ♣}
Período: 48 horas (p< 0.001; ANOVA pós-teste Tukey)		
Agente condicionador	Tempo de aplicação	
	90 seg	180 seg
AC	83,22 $\pm$ 23,46 ^{a NS *}	81,89 $\pm$ 56,86 ^{a ††}
ACTC	78,33 $\pm$ 40,11 ^{a NS ‡}	78,33 $\pm$ 85,97 ^{a Δ}
TC	172,90 $\pm$ 65,38 ^{b S ••}	60,78 $\pm$ 39,12 ^{a □}
EDTA	62,56 $\pm$ 27,54 ^{a NS °}	94,11 $\pm$ 27,97 ^{a ♦♦}
AF	32,8 $\pm$ 30,52 ^{a S #}	121 $\pm$ 67,42 ^{a ♠♠}
SF	57,11 $\pm$ 66,17 ^{a NS +}	57,78 $\pm$ 48,91 ^{a ♣}

Letras minúsculas diferentes nas colunas representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos; S- diferenças significantes entre os períodos de aplicação de 90 e 180 segundos; NS- sem diferenças significantes entre os períodos de aplicação de 90 e 180 segundos; símbolos iguais entre os grupos nos períodos de 24 e 48 horas representam ausência de diferenças significantes; símbolos diferentes entre os grupos nos períodos de 24 e 48 hora representam diferenças significantes (p< 0.001; ANOVA pós-teste Sidak)

Também foram observadas diferenças significantes no número de fibroblastos aderidos nos diferentes grupos, como pode ser observado na Tabela 10. Os resultados obtidos demonstraram adesão significativamente maior de células no grupo ACTC90 no período de 24 horas e maior efeito proliferativo (48 horas) no grupo AC90.

Tabela 10 – Número de células FLP-1 aderidas às superfícies de cimento após tratamento com as diferentes substâncias por 90 e 180 segundos (média $\pm$ desvio-padrão) nos períodos de 24 e 48 horas

Período: 24 horas (p< 0.001; ANOVA pós-teste Tukey)		
<i>Agente condicionador</i>	<i>Tempo de aplicação</i>	
	90 seg	180 seg
AC	3,33 $\pm$ 5,00 ^{a NS ♦}	8,44 $\pm$ 6,36 ^{a *}
ACTC	74,67 $\pm$ 98,84 ^{b S •}	4,22 $\pm$ 6,24 ^{a ♥}
TC	0,66 $\pm$ 0,86 ^{a NS *}	12,11 $\pm$ 16,44 ^{a ▲}
EDTA	41,67 $\pm$ 58,77 ^{a,b NS †}	15,67 $\pm$ 11,21 ^{a □}
AF	56,44 $\pm$ 56,68 ^{a,b NS π}	7,44 $\pm$ 12,24 ^{a ∇}
SF	0,77 $\pm$ 1,20 ^{a NS #}	0 ^{a ■}
Período: 48 horas (p< 0.001; ANOVA pós-teste Tukey)		
<i>Agente condicionador</i>	<i>Tempo de aplicação</i>	
	90 seg	180 seg
AC	173,8 $\pm$ 139,6 ^{a S ♦♦}	17,56 $\pm$ 9,01 ^{a *}
ACTC	15,11 $\pm$ 23,54 ^{b NS ••}	12,44 $\pm$ 11,04 ^{a ♥}
TC	0,11 $\pm$ 0,33 ^{b NS *}	0,88 $\pm$ 1,16 ^{a ▲}
EDTA	0 ^{b NS †}	17,11 $\pm$ 5,86 ^{a □}
AF	30,67 $\pm$ 17,39 ^{b NS π}	18,89 $\pm$ 19,91 ^{a ∇}
SF	0 ^{b NS #}	0,77 $\pm$ 1,30 ^{a ■}

Letras minúsculas diferentes nas colunas representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos; S- diferenças significantes entre os períodos de aplicação de 90 e 180 segundos; NS- sem diferenças significantes entre os períodos de aplicação de 90 e 180 segundos; símbolos iguais entre os ácidos nos períodos de 24 e 48 horas representam ausência de diferenças significantes; símbolos diferentes entre os grupos nos períodos de 24 e 48 horas representam diferenças significantes (p< 0.001; ANOVA pós-teste Sidak)

Porcentagem de área ocupada por células

O percentual de área ocupado pelas células FGH e FLP nos períodos de 24 e 48 horas foram analisados pelo método Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn para se detectar diferenças significantes ($p < 0.05$) entre os grupos. Nos períodos de 24 e 48 horas, não se observou diferenças significantes entre os grupos (**Tabela 11**) no percentual ocupado pelas células FGH. Também não se observou aumento significativo no percentual ocupado por células FGH no período de 48 horas em comparação ao período de 24 horas.

Por outro lado, houve diferenças significativas entre os grupos no percentual de área ocupado pelas células FLP no período de 24 horas (**Tabela 12**). Não houve presença de células nos grupos SF180 no período de 24 horas e nos grupos TC90 e SF90 no período de 48 horas.

Tabela 11- Porcentagem de área ocupada pelas células FGH nos períodos de 24 e 48 horas de observação, após o tratamento de superfície com as diferentes substâncias (média $\pm$ desvio-padrão)

Período: 24 horas (p= 0,06; Kruskal Wallis pós-teste Dunn)		
<i>Agente condicionador</i>	<i>Tempo de aplicação</i>	
	90 seg	180 seg
AC	23,13 $\pm$ 11,62 ^{a NS •}	14,72 $\pm$ 20,06 ^{a ♦}
ACTC	18,98 $\pm$ 8,54 ^{a NS *}	54,03 $\pm$ 32,16 ^{a ■}
TC	35,13 $\pm$ 4,82 ^{a NS †}	27,99 $\pm$ 9,53 ^{a □}
EDTA	70,11 $\pm$ 18,3 ^{a NS #}	59,33 $\pm$ 35,27 ^{a ✧}
AF	26,53 $\pm$ 7,64 ^{a NS +}	17,84 $\pm$ 9,26 ^{a ✨}
SF	16,79 $\pm$ 19,75 ^{a NS &}	22,83 $\pm$ 13,27 ^{a ◐}
Período: 48 horas (p= 0,35; Kruskal Wallis pós-teste Dunn)		
<i>Agente condicionador</i>	<i>Tempo de aplicação</i>	
	90 seg	180 seg
AC	20,2 $\pm$ 3,63 ^{a NS •}	31,32 $\pm$ 25,56 ^{a ♦}
ACTC	56,05 $\pm$ 38,25 ^{a NS *}	41,08 $\pm$ 52,32 ^{a ■}
TC	67,44 $\pm$ 25,74 ^{a NS †}	38,81 $\pm$ 3,11 ^{a □}
EDTA	23,16 $\pm$ 15,18 ^{a NS #}	49,49 $\pm$ 10,67 ^{a ✧}
AF	28,99 $\pm$ 27 ^{a NS +}	69,31 $\pm$ 53,16 ^{a ✨}
SF	29 $\pm$ 35,38 ^{a NS &}	15,57 $\pm$ 14,55 ^{a ◐}

Letras minúsculas diferentes nas colunas representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos; S- diferenças significantes entre os períodos de aplicação de 90 e 180 segundos; NS- sem diferenças significantes entre os períodos de aplicação de 90 e 180 segundos; símbolos iguais entre os grupos nos períodos de 24 e 48 horas representam ausência de diferenças significantes; símbolos diferentes entre os grupos nos períodos de 24 e 48 horas representam diferenças significantes (p= 0.10; Kruskal Wallis pós-teste Dunn)

Tabela 12- Porcentagem de área ocupada pelas células FLP nos períodos de 24 e 48 horas de observação, após o tratamento de superfície com as diferentes substâncias (média $\pm$ desvio-padrão)

Período: 24 horas (p= 0,02; Kruskal Wallis pós-teste Dunn)		
<i>Agente condicionador</i>	<i>Tempo de aplicação</i>	
	90 seg	180 seg
AC	8,24 $\pm$ 14,28 ^{a NS •}	20,82 $\pm$ 8,39 ^{a ♦}
ACTC	42,37 $\pm$ 23,40 ^{a NS*}	11,72 $\pm$ 10,35 ^{a ■}
TC	0,34 $\pm$ 0,58 ^{a NS †}	21,39 $\pm$ 8,63 ^{a □}
EDTA	30,43 $\pm$ 25,83 ^{a NS #}	46,52 $\pm$ 46,54 ^{a ✧}
AF	54,62 $\pm$ 14,65 ^{a NS +}	31,24 $\pm$ 29,63 ^{a ✨}
SF	3,06 $\pm$ 5,31 ^{a NS &}	0 $\pm$ 0 ^{a °}
Período: 48 horas (p= 0.04; Kruskal Wallis pós-teste Dunn)		
<i>Agente condicionador</i>	<i>Tempo de aplicação</i>	
	90 seg	180 seg
AC	68,47 $\pm$ 54,62 ^{a NS •}	13,23 $\pm$ 8,80 ^{a ♦}
ACTC	44,14 $\pm$ 44,33 ^{a NS *}	16,11 $\pm$ 15,48 ^{a ■}
TC	0 $\pm$ 0 ^{a NS †}	3,43 $\pm$ 5,94 ^{a □}
EDTA	3,55 $\pm$ 6,16 ^{a NS #}	29,49 $\pm$ 14,57 ^{a ✧}
AF	50,72 $\pm$ 42,68 ^{a NS +}	46,38 $\pm$ 43,56 ^{a ✨}
SF	0 $\pm$ 0 ^{a NS &}	2,42 $\pm$ 4,20 ^{a °}

Letras minúsculas diferentes nas colunas representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos; S- diferenças significantes entre os períodos de aplicação de 90 e 180 segundos; NS- sem diferenças significantes entre os períodos de aplicação de 90 e 180 segundos; símbolos iguais entre os grupos nos períodos de 24 e 48 horas representam ausência de diferenças significantes; símbolos diferentes entre os grupos nos períodos de 24 e 48 horas representam diferenças significantes (p= 0.007; Kruskal Wallis pós-teste Dunn)

Índice de adesão celular

Não houve diferença significativa no índice de adesão celular para as células FGH nos períodos de 24 horas e 48 horas (**Tabela 13**).

Tabela 13- Índice de adesão celular – FGH-1 nos períodos de 24 e 48 horas de observação, após o tratamento de superfície com as diferentes substâncias (mediana; 95% CI)

Período: 24 horas (p= 0,16; Kruskal Wallis pós-teste Dunn)		
Agente condicionador	Tempo de aplicação	
	90 seg	180 seg
AC	1 (-0.1; 2.7) ^{a NS •}	1 (-1.4; 3.4) ^{a ♦}
ACTC	1 (-0.1; 2.7) ^{a NS *}	3 (-1.1; 6.4) ^{a ■}
TC	2 (2; 2) ^{a NS †}	2 (0.3; 3.1) ^{a □}
EDTA	4 (0.4; 6.2) ^{a NS #}	2 (-1.3; 7.3) ^{a ✧}
AF	1 (-0.1; 2.7) ^{a NS +}	1 (-0.1; 2.7) ^{a ✖}
SF	1 (-0.1; 2.7) ^{a NS &}	1 (-0.1; 2.7) ^{a ◐}
Período: 48 horas (p= 0,30; Kruskal Wallis pós-teste Dunn)		
Agente condicionador	Tempo de aplicação	
	90 seg	180 seg
AC	1 (1;1) ^{a NS •}	2 (-0.4; 4.4) ^{a ♦}
ACTC	2 (-1.3; 7.3) ^{a NS *}	1 (-3.5; 6.8) ^{a ■}
TC	3 (0.5; 5.4) ^{a NS †}	2 (2; 2) ^{a □}
EDTA	1 (-0.1; 2.7) ^{a NS #}	2 (0.8; 3.7) ^{a ✧}
AF	2 (-0.4; 4.4) ^{a NS +}	5 (-2.0; 9.4) ^{a ✖}
SF	1 (-1.2; 4.5) ^{a NS &}	1 (-0.1; 2.7) ^{a ◐}

Letras minúsculas diferentes nas colunas representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos; S- diferenças significantes entre os períodos de aplicação de 90 e 180 segundos; NS- sem diferenças significantes entre os períodos de aplicação de 90 e 180 segundos; símbolos iguais entre os grupos nos períodos de 24 e 48 horas representam ausência de diferenças significantes (p= 0.16; Kruskal Wallis pós-teste Dunn)

A análise pelo método de Kruskal Wallis demonstrou diferenças significantes entre os grupos no período de 24 horas para as células FLP-1. Neste período, não houve adesão celular nos grupos AC90, SF90 e SF180 (**Tabela 14**). O teste de Dunn não identificou as diferenças significantes entre os grupos.

Tabela 14- Índice de adesão celular – FLP-1 nos períodos de 24 e 48 horas de observação, após o tratamento de superfície com as diferentes substâncias (mediana; 95% CI)

Período: 24 horas (p= 0,03; Kruskal Wallis pós-teste Dunn)		
<i>Agente condicionador</i>	<i>Tempo de aplicação</i>	
	90 seg	180 seg
AC	0 (-1.1; 1.7) ^a NS •	1 (-0.1; 2.7) ^a ♦
ACTC	2 (-0.4; 4.4) ^a NS *	1 (-0.7; 2.1) ^a ■
TC	1 (-0.7; 2.1) ^a NS †	2 (-0.7; 2.1) ^a □
EDTA	2 (-0.4; 4.4) ^a NS #	1 (-3.4; 8.0) ^a ✧
AF	3 (-2.1; 5.4) ^a NS +	2 (-3.4; 2.7) ^a ⌘
SF	0 (1.2; 4.1) ^a NS &	0 (0; 0) ^a °
Período: 48 horas (p= 0,03; Kruskal Wallis pós-teste Dunn)		
<i>Agente condicionador</i>	<i>Tempo de aplicação</i>	
	90 seg	180 seg
AC	5 (-2.0; 9.4) ^a NS •	1 (1; 1) ^a ♦
ACTC	2 (-2.9; 6.9) ^a NS *	1 (-1.4; 3.4) ^a ■
TC	0 (0; 0) ^a NS †	0 (-1.1; 1.7) ^a □
EDTA	0 (-1.1; 1.7) ^a NS #	2 (0.2; 3.1) ^a ✧
AF	2 (-1.3; 7.3) ^a NS +	3 (-2.8; 7.5) ^a ⌘
SF	0 (0; 0) ^a NS &	0 (-1.1; 1.7) ^a °

Letras minúsculas diferentes nas colunas representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos; S- diferenças significantes entre os períodos de aplicação de 90 e 180 segundos; NS- sem diferenças significantes entre os períodos de aplicação de 90 e 180 segundos; símbolos iguais entre os grupos nos períodos de 24 e 48 horas representam ausência de diferenças significantes (p= 0.007; Kruskal Wallis pós-teste Dunn)

Morfologia celular

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos na morfologia das células FGH-1 no período de 24 horas ($p= 0.18$; Kruskal Wallis pós-teste Dunn). Por outro lado, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na morfologia destas células no período de 48 horas ($p= 0.03$; Kruskal Wallis pós-teste Dunn), conforme observado na Tabela 15.

Por outro lado, foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos na morfologia das células FLP-1 no período de 24 horas ($p= 0.04$; Kruskal Wallis pós-teste Dunn), mas não no período de 48 horas ($p= 0.13$; Kruskal Wallis pós-teste Dunn), conforme demonstrado na Tabela 16.

Tabela 15- Análise da morfologia celular – FGH-1 nos períodos de 24 e 48 horas de observação, após o tratamento de superfície com as diferentes substâncias (mediana; 95% CI)

Período: 24 horas (p= 0.18; Kruskal Wallis pós-teste Dunn)		
Agente condicionador	Tempo de aplicação	
	90 seg	180 seg
AC	1 (1; 1) ^a NS •	4 (-1.8; 8.5) ^a ♦
ACTC	1 (-0.1; 2.7) ^a NS *	2 (-0.2; 5.5) ^a ■
TC	1 (1; 1) ^a NS †	4 (2.2; 5.1) ^a □
EDTA	1 (-3.4; 8.0) ^a NS #	2 (-1.4; 6.1) ^a ✧
AF	3 (-1.9; 7.9) ^a NS +	2 (0.2; 3.1) ^a ✽
SF	2 (0.2; 3.1) ^a NS &	1 (-0.1; 2.7) ^a °
Período: 48 horas (p= 0.03; Kruskal Wallis pós-teste Dunn)		
Agente condicionador	Tempo de aplicação	
	90 seg	180 seg
AC	1 (1; 1) ^a NS •	1 (1; 1) ^a ♦
ACTC	1 (1; 1) ^a NS *	3 (3; 3) ^a ■
TC	2 (0.2; 3.1) ^a NS †	1 (-0.1; 2.7) ^a □
EDTA	2 (-0.4; 4.4) ^a NS #	1 (1; 1) ^a ✧
AF	3 (-0.4; 7.1) ^a NS +	1 (-1.2; 4.5) ^a ✽
SF	1 (1; 1) ^a NS &	1 (-3.4; 8.0) ^a °

Letras minúsculas diferentes nas colunas representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos; S- diferenças significantes entre os períodos de aplicação de 90 e 180 segundos; NS- sem diferenças significantes entre os períodos de aplicação de 90 e 180 segundos; símbolos iguais entre os grupos nos períodos de 24 e 48 horas representam ausência de diferenças significantes (p= 0.03; Kruskal Wallis pós-teste Dunn)

Tabela 16- Análise da morfologia celular – FLP-1 nos períodos de 24 e 48 horas de observação, após o tratamento de superfície com as diferentes substâncias (mediana; 95% CI)

Período: 24 horas (p= 0.04; Kruskal Wallis pós-teste Dunn)		
Agente condicionador	Tempo de aplicação	
	90 seg	180 seg
AC	5 (-2.0; 9.4) ^a NS •	1 (-3.4; 8.0) ^a ♦
ACTC	2 (-2.5; 7.8) ^a NS *	3 (0.7; 6.5) ^a ■
TC	5 (5; 5) ^a NS †	2 (-1.4; 6.1) ^a □
EDTA	1 (1; 1) ^a NS #	3 (-0.5; 5.2) ^a ✧
AF	2 (0.2; 3.1) ^a NS +	3 (-2.3; 6.3) ^a ✖
SF	5 (5; 5) ^a NS &	5 (5; 5) ^a °
Período: 48 horas (p= 0.12; Kruskal Wallis pós-teste Dunn)		
Agente condicionador	Tempo de aplicação	
	90 seg	180 seg
AC	1 (-3.4; 8.0) ^a NS •	2 (2; 2) ^a ♦
ACTC	5 (-0.3; 8.3) ^a NS *	1 (-3.4; 8.0) ^a ■
TC	5 (5; 5) ^a NS †	5 (-2.0; 9.4) ^a □
EDTA	5 (5; 5) ^a NS ##	2 (-0.2; 3.1) ^a ✧
AF	2 (-0.4; 4.4) ^a NS +	3 (0.5; 5.4) ^a ✖
SF	5 (5; 5) ^a NS &	5 (-2.0; 9.4) ^a °

Letras minúsculas diferentes nas colunas representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos; S- diferenças significantes entre os períodos de aplicação de 90 e 180 segundos; NS- sem diferenças significantes entre os períodos de aplicação de 90 e 180 segundos; símbolos iguais entre os grupos nos períodos de 24 e 48 horas representam ausência de diferenças significantes; símbolos diferentes entre os grupos nos períodos de 24 e 48 horas representam diferenças estatisticamente significantes (p= 0.02; Kruskal Wallis pós-teste Dunn)

The background of the page is a light gray marbled paper with a complex, organic pattern of swirling, vein-like shapes. The pattern is dense and covers the entire surface, creating a textured, aged appearance. The colors are subtle, ranging from off-white to light gray, with some darker gray veins providing contrast.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

Diversas tentativas de alcançar a regeneração têm sido realizadas ao longo dos anos. Além de técnicas cirúrgicas, biomateriais são amplamente explorados e estudados com o intuito de impedir a migração epitelial e promover a regeneração periodontal (SUSIN; WIKESJÖ, 2013). Considerando-se a dificuldade ainda presente na obtenção de regeneração periodontal no dia-a-dia clínico, mais estudos que fortaleçam o embasamento científico do uso de terapias regenerativas adjuntas são importantes. Apesar de seu uso em humanos ainda não demonstrarem resultados previsíveis (MACNEIL; SOMERMAN, 1999), indícios de sucesso na utilização de biomodificadores radiculares são demonstrados em trabalhos histológicos (ALBAIR, COBB, KILLOY, 1982; COMMON, MCFALL, 1983) “*in vivo*” (PASQUINELLI, 1995), e “*in vitro*” (ZAMAN et al., 2000; SANT’ANA et al., 2007).

Tendo em vista as condições ótimas para obtenção de regeneração a partir do potencial inato do periodonto, temos em contrapartida a dificuldade de obter esta situação na realidade clínica tanto em relação à manipulação cirúrgica quanto às particularidades inerentes ao paciente (MACNEIL; SOMERMAN, 1999; SUSIN; WIKESJÖ, 2013). Com o desenvolvimento de mais estudos *in vivo*, a importância de determinadas moléculas e eventos que influenciam diretamente na adesão, proliferação, migração e diferenciação celular, pode ser determinada (MACNEIL; SOMERMAN, 1999).

Devido à suas características altamente responsivas e dinâmicas, o cimento é essencial na manutenção da integridade oclusal e suporte do dente; demonstrando altas taxas de atividade biológica e deposição de nova matriz ao longo da vida (BOSSHARDT; SELVIG, 1997). Proteínas expostas na superfície radicular, ou liberadas pelo cimento e dentina, poderiam influenciar o início do processo de reparação através da migração, divisão, adesão e diferenciação celular (BOSSHARDT; SELVIG, 1997). A desmineralização do cimento através da biomodificação radicular apresenta um grande potencial terapêutico, de forma que, ao liberar estes fatores de crescimento na ferida cirúrgica, favoreceria a migração celular no local.

Estudos recentes demonstraram que algumas proteínas e fatores de crescimento presentes no cimento tendem a favorecer a migração e adesão de FLP em comparação a células FGH (PITARU et al., 1984; SOMERMAN et al., 1988). As

duas células se comportam de maneiras diferentes *in vivo*, portanto a avaliação de ambas é fundamental no estudo de terapias regenerativas (SOMERMAN et al., 1998). Por serem estes os dois tipos celulares predominantes nos processos de reparação e regeneração dos tecidos periodontais, essas linhagens celulares cultivadas primariamente pela técnica do explante foram selecionadas para avaliação dos efeitos do condicionamento radicular *in vitro*.

Populações celulares de FGH e FLP obtidas pela técnica do explante se mostram heterogêneas, apresentando diferentes comportamentos. Isto é indicativo de diferentes funções exercidas por cada uma delas, tanto na manutenção quanto na regeneração do periodonto (SOMERMAN et al., 1998). Devido a essa heterogeneidade, não é possível comparar diretamente as taxas de adesão e proliferação de fibroblastos gengivais e de ligamento periodontal, considerando-se principalmente que os fibroblastos gengivais apresentam taxa de proliferação mais rápida do que fibroblastos de ligamento periodontal (SANT'ANA et al. 2002).

Não há necessidade da remoção completa do cimento para obtenção de inserção conjuntiva supracrestal (ALBAIR, COBB, KILLOY, 1982). Para que haja formação de cimento celular durante a regeneração, é necessário que a raiz apresente um substrato contendo cimento, uma vez que, quando o substrato é a dentina, o cimento formado tende a ser acelular (KING, COCHRAN, 2002). Estudo *in vitro* demonstrou que a nova inserção conjuntiva não se dá diretamente à dentina tratada com ácido cítrico pH 1.0 por 5 minutos, mas ao cimento remanescente ou neoformado, indicando a importância da preservação do cimento para a regeneração dos tecidos periodontais (ALBAIR et al., 1982).

Gonçalves et al. (2006) demonstraram que o cimento modula o processo de regeneração periodontal, considerando-se que em sítios onde o cimento foi removido previamente ao tratamento de defeitos de furca classe III criados experimentalmente em cães por meio de regeneração tecidual guiada houve menor ganho de inserção e formação de novo osso do que em sítios onde o cimento foi mantido. Portanto, não se deve buscar a remoção de todo o cimento quando se almeja a regeneração dos tecidos periodontais. Além disso, fatores de crescimento e proteínas específicas constituintes da matriz do cimento são essenciais para o recrutamento, adesão e proliferação de células do periodonto (ZAMAN et al. 2000).

Por estas razões, nesse estudo, investigamos os efeitos do tratamento com agentes químicos para desmineralização de superfície de cimento. Pode-se observar

que a raspagem deixou sobre a superfície dos fragmentos uma camada de indutos que não foi completamente removida pela aplicação dos diferentes agentes químicos, sem diferenças significantes entre os mesmos. Houve maior quantidade de cálculo residual nos grupos TC90 e TC180, enquanto que o grupo AC90 mostrou quantidade significativamente menor de cálculo residual. Nenhum grupo se apresentou livre de remanescentes teciduais, sendo maior no grupo TC180 e menor nos grupos AC90 e EDTA180, indicando que a contaminação superficial do cimento pode ser facilmente removida (ALEO et al. 1974, 1975). Outro estudo também demonstrou que dentes visualmente livres de cálculo apresentavam, em nível de microscopia eletrônica de varredura, cálculo residual após 10 golpes de cureta (GARRETT et al. 1978).

Além disso, possivelmente em decorrência da presença de camada de indutos ou de hipermineralização superficial (YAMADA 1968; SELVIG 1969; FURSETH 1971), não houve desobliteração completa dos túbulos dentinários em nenhum dos grupos. A formação da camada hipermineralizada após a exposição do cimento à cavidade bucal ou bolsa periodontal decorre da deposição de íons presentes na saliva e no fluido gengival, incluindo grandes quantidade de flúor (WIRTHLIN et al. 1979; FRANTZ, POLSON 1988; ADRIAENS, ADRIAENS 2004) que, em associação com a perda de colágeno, poderiam também explicar a grande resistência dos cristais minerais à desmineralização ácida *in vivo* (BOSSHARDT; SELVIG, 1997; FONTANARI et al. 2011).

Vale salientar que o presente estudo foi realizado na superfície do cimento, enquanto a maioria dos estudos de literatura avalia os efeitos do condicionamento ácido em fragmentos de dentina (REGISTER, 1973; RIRIE et al. 1980; HÉRITIER et al. 1984; FRANTZ, POLSON 1987; HANES et al. 1988; WEN et al. 1992; LABAHN et al. 1992; MADISON, HOKETT 1997; BLOMLOF et al. 1997; ISIK et al. 2000; RUGGERI et al. 2007; CHAHAL et al. 2014; NANDA et al. 2014). Alguns estudos sugeriram que altas concentrações de ácido cítrico podem promover dissolução da dentina dependendo do pH, resultando na formação de soluções de citrato de cálcio e fosfato de cálcio que diminuiriam a capacidade desmineralizante do ácido cítrico (HENNEQUIN, PAJOT, AVIGNANT 1994). No entanto, a capacidade de desmineralização do agente químico está mais relacionada ao pH do que à concentração (REGISTER, BURDICK 1975, 1976; HAZNEDAROGLU 2003). Foi relatado ocorrência de erosão de dentina radicular quando do uso de ácido cítrico 10% por 60 segundos (REIS et al. 2008), evento que não foi observado em nosso estudo.

Em raízes normais, não expostas à doença periodontal, a desmineralização superficial levou ao desenvolvimento de inserção de células e fibras em ambiente desprovido de células progenitoras dos tecidos periodontais, dessa forma enfatizando a importância de características da superfície radicular (HANES, POLSON 1989). A aplicação de ácido cítrico na superfície do cimento não contaminado resultou em desmineralização de 12µm da superfície do cimento (HANES, POLSON 1989), embora outros estudos tenham encontrado uma extensão de até 5µm de desmineralização da dentina (GARRETT et al. 1978; RIRIE et al. 1980; POLSON, PROYE 1982). Em dentes expostos à doença periodontal, a morfologia da superfície do cimento após o tratamento com ácido cítrico é diferente da morfologia do cimento não afetado (HANES, POLSON, FREDERICK 1991), sem exposição evidente de fibrilas colágenas e com a presença de uma camada desmineralizada inconsistente, assim como observado em nosso estudo; o que pode justificar os resultados variáveis e clinicamente inconsistentes investigando os efeitos do condicionamento ácido radicular no recobrimento radicular (KARAM et al. 2016).

Nossos resultados foram diferentes daqueles observados por BARROS (2013), que indicou que as soluções de gel de EDTA a 24%, ácido cítrico a 50% e ácido cítrico associado à tetraciclina resultaram em efetiva descontaminação das superfícies radiculares nos períodos de 90 e 180, embora a mesma metodologia tenha sido empregada. A variação de resultados pode ser explicada por vários fatores, tais como, grau de afiação das curetas (ADRIAENS, ADRIAENS 2004), pressão aplicada durante a raspagem (ZAPPA et al. 1991), número de golpes de curetas (CADOSCH et al. 2003), grau de mineralização superficial (ADRIAENS, ADRIAENS 2004). Porém, no estudo de Barros, não foram avaliadas a adesão e proliferação celular, eventos fundamentais para a reconstituição dos tecidos periodontais, sendo o presente estudo uma complementação daquele anteriormente realizado.

Para fins experimentais, foram aplicados em cada espécime 20 golpes de curetas após a remoção de remanescentes teciduais, placa e cálculo visível. Esses achados foram também demonstrados em outros estudos (JONES et al. 1972; JONES, O'LEARY 1978; NISHIMINE, O'LEARY 1979; RABBANI et al. 1981; BREININGER et al. 1987; BRAYER et al. 1989; NAGY et al. 1992; ANDERSON et al. 1996). Pode-se observar que não é possível padronizar uma quantidade de golpes de curetas para remoção de placa e cálculo das superfícies radiculares, visto que a maioria dos espécimes apresentou grande quantidade de remanescentes teciduais

mineralizados ou não. Um estudo demonstrou que a aplicação de, em média, 9,3 golpes de cureta sob força padronizada é capaz de remover todo o cálculo da superfície de dentes unirradiculares, com profundidade de sondagem de 5 mm, extraídos por razões periodontais. Adicionalmente, observou-se nesse estudo que o remanescente de endotoxinas diminuiu proporcionalmente à eliminação do cálculo (CADOSH et al. 2003). Assim sendo, a utilização dos agentes químicos após a raspagem não deve ter apenas o papel de descontaminação da superfície, mas também de reverter os efeitos negativos dos contaminantes impregnados à superfície radicular. Por esta razão, é importante analisar o comportamento celular sobre as superfícies tratadas, já que a contaminação radicular inibe a adesão e proliferação celular (BOYKO et al. 1980; LASHO et al. 1983; TERRANOVA et al. 1986; PITARU et al. 1984, 1987).

Embora os espécimes apresentassem remanescentes de *smear layer* e pouca ou nenhuma exposição dos túbulos, pode-se observar adesão e proliferação celular em todos os grupos. Esse achado sugere que os remanescentes teciduais calcificados ou não observados nas superfícies radiculares estavam fracamente aderidos à superfície radicular (ALEO et al. 1974, 1975) ou os efeitos tóxicos dos contaminantes puderam ser revertidos pelo condicionamento radicular, como anteriormente demonstrado em espécimes de dentes extraídos cultivados com bactérias, as quais tiveram seu crescimento inibido pela aplicação de ácido cítrico por 3 minutos. (DALY et al. 1982). Em fragmentos radiculares doentes periodontalmente e não submetidos à raspagem previamente ao condicionamento com ácido cítrico, este não foi capaz de remover a camada de indutos e contaminação bacteriana presente (GARRETT et al. 1980). Esses achados indicam que a raspagem deve ser feita previamente à aplicação de agentes químicos, os quais atuam na descontaminação de superfície, desmineralização superficial, abertura dos túbulos dentinários, exposição de colágeno, estímulo à cementogênese e osteogênese (REGISTER; BURDICK 1975, 1976; GARRETT et al. 1980; BOYKO et al. 1980; FRANK et al. 1983; POLSON et al. 1984; BLOMLÖF et al. 1997; ADRIAENS; ADRIAENS 2004).

Não houve diferenças no número de fibroblastos gengivais aderidos sobre os fragmentos dentários tratados com os diferentes agentes químicos e soro fisiológico por 90 segundos, enquanto que o EDTA aplicado por 180 segundos resultou em número significativamente maior de células FGH-1 aderidas no período

de 24 horas em comparação aos demais grupos, além de demonstrar aumento significativo no número de células aderidas depois de 48 horas em relação ao período de 24 horas. Além deste, observou-se número significativamente aumentado de células aderidas aos fragmentos radiculares dos grupos TC90, AC180 e AF180 no período de 48 horas em comparação com o período de 24 horas. Esses achados são, a princípio, divergentes de outra investigação que demonstrou diminuição na taxa de adesão celular a superfícies de cimento tratadas com ácido com o passar do tempo (HANES, POLSON 1989). Também houve, em nosso estudo, aumento significativo no número de células FLP aderidas aos fragmentos dos grupos AC90, enquanto os grupos ACTC90 e EDTA90 apresentaram, respectivamente, redução significativa e ausência completa de células FLP aderidas no período de 48 horas em comparação com o grupo de 24 horas.

Não houve diferenças no número de fibroblastos gengivais aderidos sobre fragmentos dentários tratados quimicamente com ácido cítrico (AC), ácido cítrico associado à tetraciclina (ACTC), EDTA ou soro fisiológico (SF) por 90 ou 180 segundos após 48 horas, enquanto que o tratamento com tetraciclina (TC) por 90 segundos resultou em maior número de fibroblastos gengivais aderidos aos fragmentos dentários do que a aplicação por 180 segundos. Por outro lado, o ácido fosfórico aplicado por 90 segundos resultou no menor número de células aderidas, enquanto a aplicação por 180 segundos resultou no maior número de células FGH aderidas. Esses achados sugerem que o tempo de aplicação pode variar de acordo com o tipo de agente condicionador e esses aspectos devem ser considerados quando da seleção do agente condicionador a ser utilizado.

De acordo com Heritiér et al. (1984), o condicionamento de espécimes de dentina radicular com ácido fosfórico por 60 segundos mostrou área relativamente achatada com depressões homogeneamente distribuídas correspondentes aos orifícios dos túbulos dentinários e superfície de textura fibrilar; após 120 segundos de aplicação, observou-se exposição de dentina inter-tubular, abertura e alargamento dos orifícios dos túbulos dentinários; após 180 segundos, no entanto, a superfície da dentina condicionada se tornou irregular. Altas concentrações de ácido fosfórico podem resultar em dissolução da hidroxiapatita, levando a sua deposição na superfície condicionada (MARSHALL et al. 1993; PÉREZ-HEREDIA et al., 2008). Por outro lado, estudos prévios relataram sucesso no tratamento de defeitos periodontais ou de recessão gengival empregando-se o condicionamento com ácido fosfórico a

37% durante 3 minutos (PASSANEZI et al. 1979; MILLER et al. 1982), o que poderia ser explicado pelo favorecimento à adesão de fibroblastos gengivais às superfícies tratadas, como demonstrado no presente estudo.

Segundo Fontanari et al. (2011), altas concentrações de ácido cítrico e EDTA resultam em deposição de *smear layer* decorrente da sobre-desmineralização. Em nosso estudo, não foram observados sinais evidentes de sobre-desmineralização. Não houve adesão de células FLP em espécimes tratados com EDTA90 e SF90 após 48 horas de incubação, indicando inefetividade desses agentes para a adesão e proliferação celular. Estudo anteriormente realizado por CABA-PAULINO (2014) não mostrou diferenças significantes na ampliação dos túbulos dentinários condicionados por ácido cítrico a 10% ou 50%; porém observou aumento significativo do diâmetro dos túbulos nos grupos tratados com ácido cítrico a 10% condicionados por 120 e 180 segundos em relação ao condicionamento por 60 segundos. O tempo de condicionamento ácido interferiu na adesão de células de ligamento periodontal apenas no período de 24 horas, especialmente na concentração de 50%, quando não se observou recobrimento completo dos fragmentos, diferentemente dos grupos tratados com ácido cítrico a 10%, porém com aumento significativo no período de 48 horas e atingindo 100% de ocupação depois de 72 horas. Esses resultados sugeriram que o tempo de desmineralização e a concentração de ácido cítrico, mais favorável para 10%, influenciaram a morfologia e espalhamento de fibroblastos de ligamento periodontal.

Durante o processo de reparo, o início da migração celular se dá após o fim da ação de odontoclastos na superfície radicular, deixando uma camada de fibrilas colágenas expostas onde a matriz reparatória de cemento se deposita (BOSSHARDT; SELVIG, 1997). Quando um processo resorptivo precede a deposição de matriz, o cemento reparador apresenta uma ótima adesão à superfície radicular (NANCI A & BOSSHARDT DD, 2006). Tendo isto em vista, o condicionamento radicular atuaria na mimetização desta superfície desmineralizada que, ao adquirir uma estrutura similar, poderia influenciar positivamente na formação de cemento reparador.

A locomoção dos fibroblastos é facilitada pela fibrina, colágeno e fibronectina, que ficam expostas após o condicionamento de superfície, favorecendo consequentemente a resposta cicatricial e regenerativa de feridas (POLSON et al., 1986). A rede de colágeno exposta após a desmineralização também se comporta como um arcabouço para os fibroblastos e deposição de matriz colágena nova

(FRANTZ; POLSON, 1988). A regeneração periodontal se estabelece dentro de semanas, que são então seguidas pela maturação dos tecidos. Em vista disso, estratégias de modificação e melhora na regeneração de defeitos periodontais devem estar focados na fase inicial de cicatrização das feridas (SUSIN; WIKESJÖ, 2013). Em concordância com outro estudo (ZAMAN et al., 2000), os presentes resultados demonstraram que a superfície radicular desmineralizada é favorável aos eventos cicatriciais iniciais favorecendo a migração e adesão celular quando comparados à superfície tratada apenas com a raspagem e alisamento.

Foram observadas poucas células FLP aderidas aos grupos AC90, TC90 e SF90 e em todos os grupos de 180 segundos no período de 24 horas, enquanto que no período de 48 horas, foram observados pequeno número de células aderidas nos grupos ACTC90, TC90 e em todos os grupos tratados por 180 segundos. No período de 24 horas, houve maior número de células FLP aderidas aos fragmentos tratados por ACTC por 90 segundos, enquanto que após 48 horas, observou-se resultado significativamente melhor para AC90, que demonstrou aumento significativo na proliferação celular.

Assim sendo, pode-se sugerir que quando se almeja a regeneração dos tecidos periodontais, onde as células desejáveis são provenientes do ligamento periodontal, o melhor agente químico a ser utilizado para condicionamento da superfície radicular é o ácido cítrico, aplicado passivamente por 90 segundos. Segundo Sterret et al. (1993), concentrações de ácido cítrico iguais ou superiores a 30% são menos efetivas na desmineralização de dentina após 2-3 minutos de aplicação. Em nosso estudo, foi utilizado ácido cítrico pH 1.0 na concentração de 10%, tendo este sido efetivo para a adesão e proliferação de fibroblastos de ligamento periodontal sobre a superfície de cimento contaminado no tempo de 90 segundos.

Apesar da aplicação ativa (fricção com bolinhas de algodão) ser uma forma efetiva (STERRET & MURPHY, 1989; BATISTA et al. 2005; AMARAL, 2011), neste estudo foi adotada a forma passiva, onde as diferentes soluções foram aplicadas sem fricção sobre a superfície dos espécimes, conforme metodologia descrita por Barros (2013). Resultados diferentes parecem ser obtidos quando utilizadas as formas passiva e ativa de aplicação. Embora não se tenha investigado as diferenças entre formas ativa e passiva de aplicação das substâncias nesse estudo, as diferenças nos resultados obtidos nesta investigação em relação a outros anteriormente relatados pelo nosso grupo de pesquisa (BASTOS NETO, GREGHI 2003; SANT'ANA et al.

2007; AMARAL et al. 2011; BARROS 2013) podem ser, ao menos parcialmente, creditadas a diferenças na forma de aplicação dos agentes condicionadores.

Embora tenham sido observadas diferenças no número de células aderidas aos fragmentos dentários nos períodos de 24 e 48 horas, não houve diferenças no percentual ocupado pelas células, indicando que alguns tratamentos proporcionaram adesão de células achatadas, enquanto outros resultaram em fraca adesão celular, com a presença de células ovais ou arredondadas. Chandra et al. (2006) demonstraram que fibroblastos de ligamento periodontal cultivados por 4 semanas sobre superfícies radiculares previamente doentes tratadas por fricção de ácido cítrico por 5 minutos assumiam forma de “ovo frito”, esparramadas sobre a superfície e exibindo prolongamentos celulares, enquanto as células cultivadas sobre superfícies não tratadas mostraram aspecto não saudável, com bolhas e micro-ondulações, com ausência de prolongamentos citoplasmáticos e distribuição esparsa.

Em nosso estudo, embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significantes, notou-se que alguns espécimes não apresentavam células em sua superfície, apesar da abertura dos túbulos dentinários e ausência de *smear layer*, especialmente os espécimes de EDTA180. Portanto, pode-se supor que uma superfície muito rugosa, resultante da abertura e ampliação dos orifícios dos túbulos dentinários, poderia ser repulsiva à adesão de fibroblastos de ligamento periodontal. A ausência de diferenças significantes entre os grupos pode ser explicada pelo pequeno número de espécimes avaliados. Vale ressaltar que os grupos AC90, ACTC90, TC90 e EDTA90 mostraram morfologia celular mais achatada, com prolongamentos citoplasmáticos unindo as células FGH aderidas, enquanto os grupos AC180 e TC180 apresentaram morfologia de células FGH menos saudável no período de 24 horas. No período de 48 horas, observou-se morfologia celular mais arredondada ou ovalada nos grupos AF90 e ACTC180. Nas células FLP, morfologia mais compatível com saúde foi observada nos grupos EDTA90 e AC180 no período de 24 horas e AC90 e ACTC180 no período de 48 horas.

Também não houve diferença significativa entre os grupos incubados com células FGH e FLP por 24 ou 48 horas em relação ao índice de adesão celular. Zaman et al. (2000) demonstraram que o índice de adesão celular, expresso como o comprimento da periferia da dentina ou cimento nos quais os fibroblastos de ligamento periodontal estavam aderidos em relação ao comprimento total da periferia da dentina ou cimento, foi maior nos espécimes de dentina e cimento tratados por

EDTA e ácido cítrico do que nos grupos controle e tratados com tetraciclina no dia 1. Por outro lado, o número de células aderidas aumentou significativamente nos grupos tetraciclina e controle, atingindo número de células semelhantes aos grupos EDTA e ácido cítrico. O tratamento ácido do cimento resultou em número significativamente maior de células aderidas, indicando que o tratamento com agentes químicos reverteu a contaminação do cimento, assim como observado em nosso estudo.

Os resultados não uniformes observados em nosso estudo podem explicar os achados divergentes relativos ao benefício de condicionamento ácido no tratamento clínico de pacientes, conforme descrito na literatura (KARAM et al. 2016). A variação de resultados pode ser decorrente de: falha na instrumentação mecânica, diferentes graus de mineralização do cimento ou contaminação do cimento, tipo de ácido empregado e tempo de desmineralização.

O desenvolvimento de estratégias que atraiam e mantenham células progenitoras na região a ser regenerada, é um grande objetivo dentro da periodontia. Consequentemente, este trabalho visou contribuir com mais resultados a nível celular “*in vitro*”, necessários para a constante melhora, e futuras descobertas, de parâmetros e formas de utilização da biomodificação radicular com maior efetividade a nível celular, permitindo a implementação eficaz em futuras pesquisas clínicas.

The background of the page is a light gray marbled paper with a complex, organic pattern of swirling, vein-like shapes in slightly darker and lighter shades of gray, creating a textured, stone-like appearance.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Dentro dos limites desse estudo, pode-se observar que:

- Nenhum tratamento foi completamente eficaz na remoção de indutos da superfície radicular;
- O tratamento com EDTA por 180 segundos é significativamente melhor na adesão (24 horas) de fibroblastos gengivais do que os demais tipos de tratamento, enquanto a aplicação de tetraciclina por 90 segundos é significativamente melhor na proliferação (48 horas) de fibroblastos gengivais humanos;
- O tratamento com ACTC por 90 segundos é significativamente melhor na adesão (24 horas) de fibroblastos de ligamento periodontal, porém sem diferenças significantes em relação aos tratamentos com EDTA e AF por 90 segundos, enquanto que o AC90 é significativamente melhor do que todas as demais formas de tratamento na proliferação (48 horas) de fibroblastos de ligamento periodontal;
- Não existem diferenças significantes na área ocupada por fibroblastos gengivais e de ligamento periodontal entre os grupos, nos dois períodos de observação;
- Não existem diferenças significantes no índice de adesão celular para fibroblastos gengivais e de ligamento periodontal entre os grupos, nos dois períodos de observação;
- Não existem diferenças significantes entre os grupos na morfologia das células fibroblásticas de gengiva e de ligamento periodontal entre os grupos, nos dois períodos de observação, sugerindo que as substâncias não alteram significativamente a morfologia celular.

Diante desses achados, pode se sugerir que a substância a ser utilizada para o condicionamento ácido das superfícies radiculares deve ser escolhida de acordo com os objetivos do tratamento periodontal: quando se objetiva a formação de nova inserção conjuntiva, sugere-se o uso do EDTA por 180 segundos ou da tetraciclina por 90 segundos; quando se objetiva a regeneração dos tecidos periodontais, sugere-se o uso de AC por 90 segundos.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABED, A. M. et al. Debris and smear layer removal efficacy and changes in morphology of dentinal tubules after using citric acid, tetracycline-hydrochloride and mixture of tetracycline and acid and detergent. **Dent Res Journal**, v.10, n.2, p. 232-237. 2013
- ADRIAENS, P. A.; ADRIAENS, L. M. Effects of nonsurgical periodontal therapy on hard and soft tissues. **Periodontol 2000**, v. 36, p.121-145. 2004.
- ADRIAENS, P. A.; De BOEVER, J. A.; LOESCHE, W. J. Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans - a reservoir of periodontopathogenic bacteria. **J Periodontol**, v. 59, p.222-230. 1988.
- ALBAIR, W. B.; COBB, C. M.; KILLOY, W. J. Connective tissue attachment to periodontally diseased roots after citric acid demineralization. **J Periodontol**, v. 53, n. 8, p.515-526. Agosto, 1982.
- ALEO, J. J.; De RENZIS, F. A.; FARBER, P. A. In vitro attachment of human gingival fibroblasts to root surfaces. **J Periodontol**, v. 46, p. 639-645. 1975.
- ALEO, J. J. et al. The presence and biologic activity of cementum-bound endotoxin. **J Periodontol**, v. 45, p. 672-675. 1974.
- AMARAL, N.G. et al. Comparison among four commonly used demineralizing agents for root conditioning. A scanning electron microscopy. **J Appl Oral Sci**, v. 19, n. 5, p.469-475. 2011.
- ANDERSON, G.B. et al. Effectiveness of subgingival scaling and root planning: single versus multiple episodes of instrumentation. **J Periodontol**, v.67, p. 367-373. 1996.
- ARMITAGE, G. C., CHRISTIE, T. M. Structural changes in exposed human cementum. I. Light microscopic observations. **J Periodontal Res**, v.8, p. 343-355. 1973.
- ARMITAGE, G. C., CHRISTIE, T. M. Structural changes in exposed human cementum. II. Electron microscopic observations. **J Periodontal Res**, v. 8, p. 356-365. 1973.

- BAKER PJ, EVANS RT, COBURN RA, GENCO RJ. Tetracycline and its derivatives strongly bind to and are released from the tooth surface in active form. **J Periodontol**, v. 54, p. 580-585. 1983.
- BARROS, J. P. C. **Avaliação dos efeitos de diferentes agentes condicionadores na descontaminação da superfície radicular**: estudo *in vitro* e *in vivo*. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2013.
- BASS, C. C. A previously undescribed demonstrable pathologic condition in exposed cementum and the underlying dentine. **Oral Sur Oral Medi Oral Pathol**, v.4, p. 641-652. 1951.
- BASTOS NETO, F. V.; GREGHI, S. L. A. Análise em microscopia eletrônica de varredura de superfícies radiculares antes e após raspagem e condicionamento com ácido cítrico e EDTA: um estudo "in vitro". **J Applied Oral Sci**, v.11, n. 1, p. 41-47. 2003.
- BATISTA, L.H.C. et al. Efficacy of EDTA-T gel for smear layer removal at root surfaces. **Quint Int**, v. 36, p. 551-558. 2005.
- BEERTSEN, W.; MCCULLOCH, C.A.G.; SODEK, J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. **Periodontology 2000** 1997. 13:20-40.
- BELAL, M.H. Effect of PDGF-BB combined with EDTA gel on adhesion and proliferation to the root surface. **Odontology**, v. 100, p.206-214. 2012.
- BITTENCOURT, S. Root surface biomodification with EDTA for the treatment of gingival recession with a semilunar coronally repositioned flap. **J Periodontol**, v.78, n.9, p. 1695-1701. 2007.
- BLOMLÖF, J; BLOMLÖF, L; LINDSKOG, S. Effect of different concentrations of EDTA on smear removal and collagen exposure in periodontitis-affected root surfaces. **J Clin Periodontol**, v.24, n.8, p. 534-537. Agosto, 1997.
- BLOMLÖF, J.; BLOMLÖF, L.; LINDSKOG, S. Ultrasonic subgingival root planing and EDTA etching in a one-step procedure. **Swed Dent J**, v.21, n.6, p. 213-219. 1997.
- BLOMLÖF, J. et al. Root surface etching at neutral pH promotes periodontal healing. **J Clin Periodontol**, v. 23, p.50-55. 1996a.

BLOMLÖF, J. et al. Long time etching at low pH jeopardizes periodontal healing. **J Clin Periodontol**, v. 22, p. 453-463. 1995.

BLOMLÖF, J. Root cementum appearance in healthy monkeys and periodontitis-prone patients after different etching modalities. **J Clin Periodontol**, v.23, p. 12-18. 1996b.

BLOMLÖF, J.P.; BLOMLÖF, L.B.; LINDSKOG, S.F. Smear layer formed by different root planing modalities and its removal by an ethylenediaminetetraacetic acid gel preparation. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v.17, n.3, p. 242-249. Junho, 1997.

BLOMLÖF, J.P.; BLOMLÖF, L.B.; LINDSKOG, S.F. Smear removal and collagen exposure after non-surgical root planing followed by etching with an EDTA gel preparation. **J Periodontol**, v. 67, p. 841-845. 1996c.

BLOMLÖF, L. et al. A clinical study of root surface conditioning with an EDTA gel. I. Nonsurgical periodontal treatment. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 20, p. 560-565. 2000.

BLOMLÖF, L. et al. A clinical study of root surface conditioning with an EDTA gel. II. Surgical periodontal treatment. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v.20, p.566-573. 2000.

BLOMLOF, J.; LINDSKOG, S. Periodontal tissue vitality after different etching modalities. **Journal of Clinical Periodontology** 1995; 22:464- 68.

BLOMLÖF, J.; LINDSKOG, S. Root surface texture and early cell and tissue colonization after different etching modalities. **European Journal of Oral Science**, v. 103, p. 17-24. 1995.

BOGLE, G. et al. New connective tissue attachment in beagles with advanced natural periodontitis. **J Periodontal Res**, v.18, n.2, p. 220-228. 1983.

BOSSHARDT, D. D.; SELVIG, K. A. Dental cementum: the dynamic tissue covering the root. **Periodontology** 2000, v.13, p. 41-75. 1997.

BOYAN, B.D. et al. Osteoblasts generate an osteogenic microenvironment when grown on surfaces with rough microtopographies. **Eur Cells Mat**, v. 5, n.2, p. 11-12. 2003.

- BOYAN, B.D. et al. Pretreatment of bone with osteoclasts affects phenotypic expression of osteoblast-like cells. **J Orthop Res**, v. 21, p. 638-647. 2003.
- BOYKO, G.A.; BRUNETTE, D.M.; MELCHER, A.H. Cell attachment to demineralized root surfaces in vitro. **J Periodontal Res**, v.15, n.3, p. 297-303. 1980.
- BOYKO, G.A.; MELCHER, A.H.; BRUNETTE, D.M. Formation of new periodontal ligament by periodontal ligament cells implanted in vivo after culture in vitro. A preliminary study of transplanted roots in the dog. **J Periodontal Res**, v. 16, n. 1, p. 73-88. 1981.
- BRAYER, W.K. et al. Scaling and root planning effectiveness: the effect of root surface access and operator experience. **J Periodontol**, v. 60, p. 67-72. 1989.
- BREININGER, D.R.; O'LEARY, T.J.; BLUMENSHINE, R.V. Comparative effectiveness of ultrasonic and hand scaling for the removal of subgingival plaque and calculus. **J Periodontol**, v. 58, p. 9-18. 1987.
- CADOSCH, J. et al. Root surface debridement and endotoxin removal. **J Periodontal Res**, v. 38, n. 3, p. 229-36. Junho, 2003.
- CAFFESSE, R. G. et al. Citric acid demineralization and subepithelial connective tissue grafts. **J Periodontology**, v. 71, n. 4, p. 568-572. 2000.
- CARNIO, J. Histological evaluation of 4 cases of root coverage following a connective tissue graft combined with an enamel matrix derivative preparation. **J Periodontology**, v. 73, n. 12, p. 1534-1543. 2002.
- CHAHAL, G.S. et al. Effect of citric acid, tetracycline, and doxycycline on instrumented periodontally involved root surfaces: a SEM study. **J Indian Soc Periodontol**, v. 18, n. 1, p. 32-37. 2014.
- CHAVES, E. et al. The effect of citric acid application on periodontally involved root surfaces. II. An in vitro scanning electron microscopic study. **Int J Periodontics Rest Dent**, v. 13, n. 2, p. 189-196. 1993.
- CHENG, Y-F. Is coronally positioned flap procedure adjunct with enamel matrix derivative or root conditioning a relevant predictor for achieving root coverage? A systemic review. **J Periodont Res**, v. 42, p. 474-485. 2007.

-
- CIZZA, N.; MIGUES, D. Progressive root resorption associated with the treatment of deep gingival recession: a clinical case. **International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 30, p. 619-625. 2010.
- CLAFFEY, N. et al. Topical application of tetracycline in regenerative periodontal surgery in beagles. **Acta Odontol Scand**, v. 45, n. 3, p. 141-146. 1987.
- CODELLI, G.R.; FRY, H.R.; DAVIS, J.W. Burnished versus nonburnished application of citric acid to human diseased root surfaces: the effect of time and method of application. **Quintessence Int**, v. 22, n. 4, p. 277-283. 1991.
- CRIGGER, M. et al. The effect of topical citric acid application on the healing of experimental furcation defects in dogs. **J Periodontal Res**, v. 13, n. 6, p. 538-549. 1978.
- CRIGGER, M.; RENVERT, S.; BOGLE, G. The effect of topical citric acid application on surgically exposed periodontal attachment. **J Periodontal Res**, v. 18, n. 3, p. 303-305. 1983.
- CURY, P.R. et al. Root resorption and ankylosis associated with guided tissue regeneration. **Journal of the American Dental Association**, v. 136, n. 3, p. 337-341. 2005.
- DALY, C.G. Anti-bacterial effect of citric acid treatment of periodontally-diseased root surfaces in vitro. **J Clin Periodontol**, v. 9, p. 386-392. 1982.
- DALY, C.G. et al. Histological assessment of periodontally involved cementum. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 9, p. 266-274. 1982.
- DAMANTE, C. A. et al. In vitro evaluation of adhesion/proliferation of human gingival fibroblasts on demineralized root surfaces by toluidine blue O in antimicrobial photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 13, p. 303-307. 2016.
- DEMIREL, K.; BAER, P. N.; MCNAMARA, T. F. Topical application of doxycycline on periodontally involved root surfaces in vitro: comparative analysis of substantivity on cementum and dentin. **J Periodontol**, v. 62, n. 5, p. 312-316. Maio, 1991.
- DICKINSON, D. P. et al. Events of wound healing/regeneration in the canine supraalveolar periodontal defect model. **J Clinical Periodontol**, v. 40, n. 5, p. 527-541. Maio, 2013.

FONTANARI, L.M. Influence of dental exposure to oral environment on smear layer removal and collagen exhibition after using different conditioning agents. **Braz Dent J**, v. 22, n. 6, p. 479-485. 2011.

FRANK, R. M.; FIORE-DONNO, G.; CIMASONI, G. Cementogenesis and soft tissue attachment after citric acid treatment in a human. An electron microscopic study. **J Periodontol**, v. 54, n. 7, p. 389-401. Julho, 1983.

FRANTZ, B.; POLSON, A. Tissue interactions with dentin specimens after demineralization using tetracycline. **J Periodontol**, v. 59, n. 11, p. 714-721. Novembro, 1988.

FURSETH, R. Further observations of the fine structure of orally exposed and carious human dental cementum. **Arch Oral Biol**, v. 16, p. 71-79. 1971.

GAMAL, A.Y. et al. Human Periodontal ligament fibroblast response to PDGF-BB and IGF-1 application on tetracycline HCl conditioned root surfaces. **J Clin Periodontol**, v. 25, n. 5, p. 404-412. 1998.

GAMAL, A.Y.; MAILHOT, J.M. The effect of local delivery of PDGF-BB on attachment of human periodontal ligament fibroblasts to periodontitis-affected root surfaces--in vitro. **J Clin Periodontol**, v. 27, n. 5, p. 347-53. 2000.

GAMAL, A.S.; MAILHOT, J.M. Effects of EDTA gel preconditioning of periodontally affected human root surfaces on chlorhexidine substantivity. A SEM study. **J Periodontol**, v. 78, p. 1759-1766. 2007.

GARRET, J.S.; CRIGGER, M.; EGELBERG, J. The effects of citric acid on diseased root surfaces. **J Periodontal Res**, v.13, p. 155-163. 1978.

GARRET, J.S. et al. Healing of periodontal connective tissues following surgical wounding and application of citric acid in dogs. **J Periodontal Res**, v. 15, p. 314-327. 1980.

GONÇALVES, P. F. Root cementum modulates periodontal regeneration in class III furcation defects treated by the guided tissue regeneration technique: a histometric study in dogs. **Journal of Periodontology**, v. 77, p. 976-982. 2006.

HANES, P.J.; O'BRIEN, N.J.; GARNICK, J.J. A morphological comparison of radicular dentin following root planning and treatment with citric acid or tetracycline HCl. **J Clin Periodontol**, v. 18, n. 9, p. 660-668. 1991.

HANES, P. J.; POLSON, A. M. Cell and fiber attachment to demineralized cementum from normal root surfaces. **J Periodontol**, v. 60, n. 4, p. 188-198. 1989.

HANES, P.J.; POLSON, A.M.; FREDERICK, G.T. Root and pulpal dentin after surface demineralization. **Endod Dent Traumatol**, v. 2, n. 5, p. 190-195. 1986.

HANES, F.; POLSON, A.; FREDERICK, T. Citric acid treatment of periodontitis-affected cementum. A scanning electron microscopic study. **J Clin Periodontol**, v.18, p. 567-575. 1991.

HAZNEDAROGLU, F. Efficacy of various concentrations of citric acid at different pH values for smear layer removal. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod**, v. 96, n. 3, p. 340-344. 2003.

HENNEQUIN, M.; PAJOT, J.; AVIGNANT, D. Effects of different pH values of citric acid solutions on the calcium and phosphorous contents on human root dentin. **J Endod**, v. 20, n. 11, p. 551-554. 1994.

HERITIER, M. Effects of phosphoric acid on root dentin surface. A scanning and transmission electron microscopic study. **J Periodontal Res**, v.19, p. 168-176. 1984.

HÜLSMANN, M.; RÜMMELIN, C.; SCHÄFERS, F. Root canal cleanliness after preparation with different endodontic handpieces and hand instruments: a comparative SEM investigation. **J Endod**, v. 23, p. 301–306. 1997.

ISIK, A.G. et al. A comparative scanning electron microscopic study on the characteristics of demineralized dentin root surface using different tetracycline HCl concentrations and application times. **J Periodontol**, v. 71, p. 219-225. 2000.

JONES, S.J.; LOZDAN, J.; BOYDE A. Tooth surfaces treated in situ with periodontal instruments. **Br Dent J**, v. 132, p. 57-64. 1972.

JONES, W.A.; O'LEARY, T.J. The effectiveness of root planing in removing bacterial endotoxin from the roots of periodontally involved teeth. **J Periodontol**, v. 49, p. 337-342. 1978.

KARAM, P. S. B. H. et al. Root surface modifiers and subepithelial connective tissue graft for treatment of gingival recessions: a systematic review. **Journal of Periodontal Research**, v. 51, n. 2, p. 175-185. Abril, 2015

KASAJ et al. Early root surface colonization by human periodontal ligament fibroblasts following treatment with different biomaterials. **Acta Odontol**

Scandinavica, v. 71, p.1579-1587. 2013.

KASSAB, M. M. et al. The effect of EDTA in attachment gain and root coverage. **Compendium of Continuing Education in Dentistry**, v. 27, n. 6, p. 353-360. 2006.

KING, G. N.; COCHRAN, D. L. Factors that modulate the effects of bone morphogenetic protein-induced periodontal regeneration: a critical review. **J Periodontol**, v. 73, p. 925-936. 2002

LABAHN, R. et al. Root dentin morphology after different modes of citric acid and tetracycline hydrochloride conditioning. **J Periodontol**, v. 63, n. 4, p. 303-309. 1992.

LAFFERTY, T.A.; GHER, M.A.; GRAY, I.L. Comparative SEM study on the effect of acid etching with tetracycline HCl or citric acid on instrumented periodontally involved human root surfaces. **J Periodontol**, v. 64, p. 689-693. 1993.

LASHO, D.J.; O'LEARY, T.J.; KAFRAWY, A.H. A scanning electron microscope study of the effects of various agents on instrumented periodontally involved root surfaces. **J Periodontol**, v. 54, n. 4, p. 210-220. 1983.

LEITE, F.R.M. et al Influence of root-surface conditioning with acid and chelating agents on clot stabilization. **Quintessence Int**, v. 41, p. 341-349. 2010.

LIE T, MEYER K. Calculus removal and loss of tooth substance in response to different periodontal instruments. A scanning electron microscope study. **J Clin Periodontol**. v. 4, n. 4, p. 250-62. Novembro, 1977.

LIU, W. J. L.; SOLT, C. W. A surgical procedure for the treatment of localized gingival recession in conjunction with root surface citric acid conditioning. **J. Periodontol**, v. 51, n. 9, p. 505-509. Setembro, 1980.

MACNEIL, R. L.; SOMERMAN, M. J. Development and regeneration if the periodontium: parallels and contrasts. **Periodontol 2000**, v. 19, p. 8-20. 1999.

MADISON, J.G. 3RD; HOKETT, S.D. The effects of different tetracyclines on the dentin root surface of instrumented, periodontally involved human teeth: a comparative scanning electron microscope study. **J Periodontol**, v. 68, n. 8, p. 739-745. 1997.

MARIOTTI, A. Efficacy of chemical root surface modifiers in the treatment of periodontal disease. A systematic review. **Ann Periodontol**, v. 8, n. 1, p. 205-226. 2003.

MELCHER AH. On the repair potential of periodontal tissues. **J Periodontol**, v. 47, n. 5, p. 256-260. 1976.

MEYER JR. The regenerative potential of the periodontal ligament. **J Prost Dent**, v. 55, n. 2, p. 260-265. 1986.

MEYER, K.; LIE, T. Root surface roughness in response to periodontal instrumentation studied by combined use of microroughness measurements and scanning electron microscopy. **J Clin Periodontol**. v. 4, n. 2, p. 77-91. Maio, 1977.

MILLER, P.D. JR. Root coverage using a free soft tissue autograft following citric acid application. Part 1: Technique. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 2, n. 1, p. 65-70. 1982.

NAGY, R.J.; OTOMO-CORGEL, J.; STAMBAUGH, R. The effectiveness of scaling and root planning with curets designed for deep pockets. **J Periodontol**, v. 63, p. 954-959. 1992.

NALBANDIAN, J.; COTE, N. Direct histological comparison of periodontal wound healing in the beagle dog with and without citric acid conditioning. **J Periodontal Res**, v.17, n. 6, p. 552-562. Novembro, 1982;

NANCI, A.; BOSSHARDT, D. D. Structure of periodontal tissues in health and disease. **Periodontology 2000**, v. 40, p. 11-28. 2006.

NANDA, T. et al. Root conditioning in periodontology – revisited. **J Natural Sci Biol Med**, v. 5, n. 2, p. 356-358. 2014.

NE, R. F.; WITHERSPOON, D. E.; GUTMANN, J. L. Tooth resorption. **Quintessence International**, v. 30, n. 1, p. 9-25. 1999.

NISHIMINE, D.; O'LEARY, T.J. Hand instrumentation versus ultrasonics in the removal of endotoxins from root surfaces. **J Periodontol**, v. 50, p. 345-349. 1979.

OLIVEIRA, G.H.C.; MUNCINELLI, E.A.G. Efficacy of root surface biomodification in root coverage: a systematic review. **J Canad Dent Assoc**, v. 78, p. c122. 2012.

PALIOTO, D. B. et al. Comparação entre fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal de um mesmo indivíduo. **Pesq Odontol Bras**, v. 16, n. 4, p. 319-325. 2002.

PASHLEY, D. H. Smear layer: physiological considerations. **Operative Dentistry** 1984;9(Supl 3):13-29.

PASSANEZI, E. et al. Periosteal activation and desmineralization associated with horizontal sliding flap. **J Periodontol**, v. 50, p. 384-386. 1979.

PAULINO, C. E. C. **Efeito do protocolo de desmineralização por ácido cítrico na área de superfície radicular recoberta por fibroblastos do ligamento periodontal humano. Estudo à microscopia eletrônica de varredura.** Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2014.

PETERSEN PE, BAEHNI PC. Periodontal Health and global public health. **Periodontology 2000**, v. 60, p. 7-14. 2012.

PETERSEN, P.E.; OGAWA, H. Strengthening the prevention of periodontal disease: The WHO approach. **J Periodontol**, v. 76, p. 2187-2193. 2005.

PETERSILKA, G. J.; EHMKE, B.; FLEMMIG, T. F. Antimicrobial effects of mechanical debridement. **Periodontology 2000**, v. 28, p. 56-71. 2002.

PITARU, S.; MELCHER, A. H. Organization of an oriented fiber system in vitro

by human gingival fibroblasts attached to dental tissue: relationship between cells and mineralized and demineralized tissue. **Journal of Periodontal Research**, v. 22, p. 6-13. 1987.

POLSON, A.M.; FREDERICK, G.T. Cell processes in dentin tubules during early phases of attachment to demineralized periodontitis-affected surfaces. **J Clin Periodontol**, v. 12, n. 2, p. 162-169. 1985.

POLSON, A. M. et al. The production of a root surface smear layer by instrumentation and its removal by citric acid. **Journal of Periodontology**, v. 55, n. 8, p. 443-446. 1984.

POLSON, A. M.; LADENHEIM, S.; HANES, P. J. Cell and fiber attachment to demineralized dentin from periodontitis-affected root surfaces. **J Periodontol**, v. 57, n. 4, p. 235-246. 1986.

RABBANI, G.M.; ASH, M.M.; CAFFESSE, R.G. The effectiveness of subgingival scaling and root planning in calculus removal. **J Periodontol**, v. 52, p. 119-123. 1981.

REGISTER AA, BÜRDICK FA. Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized in situ. II. Defect repair. **J Periodontol**, v. 47, p. 497-505. 1976.

REGISTER, A. A. bone and cementum induction by dentin demineralized in situ. **Journal of Periodontology**, v. 44, p. 49-54. 1973.

REGISTER, A.; BURDICK, F. Accelerated Reattachment with Cementogenesis to Dentin, Demineralized in situ. I. Optimum Range. **Journal of Periodontology**, v. 44, p. 646-651. 1975.

REIS, C. et al. Strong effect on dentin after the use of high concentrations of citric acid: an assessment with co-site optical microscopy and ESEM. **Dent Mater**, v. 24, n. 12, p. 1608-1615. 2008.

RENVERT S, EGELBERG J. Healing after treatment of periodontal intraosseous defects. II. Effect of citric acid conditioning of the root surface. **J Clin Periodontol**, v.8, p. 459-73. 1981.

RIRIE, C.M.; CRIGGER, M.; SELVIG, K.A. Healing of periodontal connective tissues following surgical wounding and application of citric acid in dogs. **J Periodontal Res**, v. 15, p. 314-327. 1980.

ROMPEN, E.H.; GOFFINET, G.H.; NUSGENS, B. Human periodontal ligament fibroblast behavior on chemically conditioned dentine: an in vitro study. **J Periodontol**, v. 70, n. 10, p. 1144-1152. 1999.

RUGGERI JR, A. et al. Effects of citric acid and EDTA conditioning on exposed root dentin: an imunohistochemical analysis of collagen and proteoglycans. **Archives in Oral Biology**, v. 52, n. 1, p. 1-8. 2007.

RYAN, P.C. et al. The pulpal response to citric acid in cats. **Journal of Clinical Periodontology**, v.11, p. 633-43. 1984.

RYLANDER, H.; LINDHE, J. Terapia periodontal associada à causa. In: LINDHE, J. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral** 1999; 3ªed.pp. 314-331.

SANT'ANA, A. C. P. et al. Cultura e caracterização de células derivadas de ligamento periodontal humano. **Rev Fac Odontol Bauru**, Bauru, v. 10, n. 3, p. 134-140. 2002.

SANT'ANA, A. C. P. et al. Effects of TGF- β 1, PDGF-BB, and IGF-1 on the rate of

proliferation and adhesion of a periodontal ligament cell lineage in vitro. **J Periodontol**, v. 78, n. 10, p. 2007-2017. 2007.

SCELZA, M.F. et al. Effect of three different time periods of irrigation with EDTA-T, EDTA and citric acid on smear layer removal. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 98, p. 499-503. 2004.

SELVIG, K. Biological changes at the tooth-saliva interface in periodontal disease. **J. Dent. Res**, v. 48, p. 846-855. 1969.

SHETTY, B.; DINESH, A.; SESTRAN, 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**, v. 12, n. 1, p. 8-15. 2008.

SOMERMAN, M. J. et al. In vitro evaluation of extracts of mineralized tissues for their application in attachment of fibrous tissue. **J Periodontol**, v. 85, n. 5, p. 349-351. Maio, 1987.

STABHOLZ, A. et al. Antimicrobial properties of human dentin impregnated with tetracycline HCL or chlorhexidine. An in vitro study. **J Clin Periodontol**, Oxford, v. 20, p. 557-562. 1993.

STERRETT JD, BANKEY T, MURPHY HJ. Dentin demineralization. The effects of **citric acid concentration** and application time. **J Clin Periodontol**, v. 20, n. 5, p. 366-70. Maio, 1993.

STERRET, J.D. et al. Tetracycline demineralization of dentin: the effects of concentration and application time. **J Clin Periodontol** 1997; 24:457-463.

SUSIN, C.; WIKESJÖ, U. M. E. Regenerative periodontal therapy: 30 years of lessons learned and unlearned. **Periodontology 2000** 2013; 62: 232-242.

TERRANOVA, V. P. et al. A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth. **J Periodont Res**, v. 21, p. 330. Julio, 1986

THEODORO, L.H. et al. Comparative analysis of root surface smear layer removal by different etching modalities or erbium:yttrium-aluminum-garnet laser irradiation. A scanning electron microscopy study. **Laser Med Sci**, v. 25, p. 485-491. 2010.

TROMBELLI, L.; SCABBIA, A.; CALURA, G. Nondiseased cementum and dentin root surface following tetracycline hydrochloride conditioning: SEM study of the effects of

solution concentration and application time. **Int J Periodontics Rest Dent**, v. 14, n. 5, p. 460-469. 1994.

URIST, M.R. Bone histogenesis and morphogenesis in implants of demineralized enamel and dentin. **J Oral Surg**, v. 29, p. 88. 1971.

URIST, M. R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, v. 150, n. 3698, p. 893-899. 1965.

WAERHAUG J. Healing of the dento-epithelial junction following subgingival plaque control. II: as observed on extracted teeth. **J Periodontol**, v. 49, n.3, p. 119-134. 1978.

WEN, C.R. et al. In vitro effects of citric acid application techniques on dentin surfaces. **J Periodontol**, v. 63, n. 11, p. 883-889. 1992.

WIKESJÖ, U.M.E. et al. A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment conditions dentin surfaces. **J Periodont Res**, v. 21, p. 322-329. 1986.

WIKESJÖ, U. M. E. et al. Dynamics of wound healing in periodontal regenerative therapy. **Journal of Californian Dental Association**, v. 23, n. 12, p. 30-35. 1995.

WIRTHLIN, M.R. et al. The hypermineralization of diseased root surfaces. **J Periodontol**, v. 50, p. 125-127. 1979.

YAMADA, N. Fine structure of exposed cementum in periodontal disease. **Bull Tokyo Med Dent Univ**, v. 15, p. 409-34. 1968.

ZAMAN, K. U. et al. 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**, v. 71, n. 7, p.1094-1099. 2000.

ZANDIM, D.L. et al. Wound healing of dehiscence defects following different conditioning modalities: an experimental study in dogs. **Clin Oral Invest**, v. 17, p. 1585-1593. 2013.

ZAPPA, U. et al. In vivo scaling and root planning forces. **J Periodontol**. v. 62, n. 5, p. 335-340. Maio, 1991

ZAPPA, U. et al. Root substance removal by scaling and root planning. **J Periodontol**, v. 62, n.12, p. 750-754. Dezembro, 1991.

Apêndices

APÊNDICE A - Células FGH-1, proliferando-se a partir de explante de tecido gengival em aumentos de 4x (a), 10x (b), 20x (c) e 40x (d).

APÊNDICE B – Células FGH-1, ao atingir camada subconfluente após cultura estabelecida, em aumentos de 20x (a) e 40x (b).

APÊNDICE C – Primeiras células FLP-1, estabelecidas através de cultura primária, em aumentos de 4x **(a)** e 20x **(b)**.

APÊNDICE D – Células FLP-1, ao atingir camada subconfluente após cultura estabelecida, em aumentos de 4x (a), 10x (b), 20x (c) e 40x (d).

APÊNDICE E – Plaqueamento de células FGH-1 (adjacente à superfície radicular em preto).

APÊNDICE F – 24 e 48 horas após o plaqueamento de células FGH-1 (adjacente à superfície radicular em preto).

APÊNDICE G – Teste Kappa para análise de concordância no Índice da Presença de Restos Teciduais (IPRT) em imagens digitais (aumento de 500x) aleatoriamente selecionadas

Escore	Amostra	1	2	3
1	1_2	2	2	2
2	2	1	1	1
3	9_3	5	2	2
4	7_2	4	4	4
5	10	2	5	2
	12_2	3	3	3
	8_2	3	3	3
	4_2	4	3	4
	10_3	1	1	1
	6_3	2	2	2

k= 0.738; p< 0.001

APÊNDICE H – Teste Kappa para análise de concordância na contagem de células nas imagens digitais (aumento de 500x) no período de 24h.
aleatoriamente selecionadas

Escore	Nº células presentes	Amostra	Image m	Avaliação 1	Avaliação 2	Avaliação 3
a	1 a 15	amostra 1	2 A2	c	c	c
b	16 a 30	amostra 2	4 A4	a	a	a
c	31 a 50	amostra 3	6 B1	d	d	d
d	51 a 70	amostra 4	3 A3	b	b	b
e	71 a 90	amostra 5	9 B4	f	f	f
f	> 90	amostra 6	7 B2	e	e	e
		amostra 7	9 B4	f	f	f
		amostra 8	11 B6	c	c	c
		amostra 9	10 B5	a	a	a
		amostra 10	8 B3	e	e	e

Kappa geral = 1.0; $p < 0.001$

APÊNDICE I – Fotomicrografias em MEV dos fragmentos radiculares tratados pelos diferentes agentes condicionadores e cultivados com células FGH-1, no período de 24 horas

Legenda: Imagens de MEV representativas de espécimes dos grupos AC90 (A1) e AC180 (A2); ACTC90 (B1) e ACTC180 (B2); TC90 (C1) e TC180 (C2); EDTA90 (D1) e EDTA180 (D2); AF90 (E1) e AF180 (E2); SF90 (F1) e SF180 (F2) cultivados com células FGH-1. Aumento de 500x.

APÊNDICE J– Fotomicrografias em MEV dos fragmentos radiculares tratados pelos diferentes agentes condicionadores e cultivados com células FGH-1 no período de 48 horas

Legenda: Imagens de MEV representativas de espécimes dos grupos AC90 (A1) e AC180 (A2); ACTC90 (B1) e ACTC180 (B2); TC90 (C1) e TC180 (C2); EDTA90 (D1) e EDTA180 (D2); AF90 (E1) e AF180 (E2); SF90 (F1) e SF180 (F2) cultivados com células FGH-1. Aumento de 500x.

APÊNDICE K – Fotomicrografias em MEV dos fragmentos radiculares tratados pelos diferentes agentes condicionadores e cultivados com células FLP, no período de 24 horas

Legenda: Imagens de MEV representativas de espécimes dos grupos AC90 (A1) e AC180 (A2); ACTC90 (B1) e ACTC180 (B2); TC90 (C1) e TC180 (C2); EDTA90 (D1) e EDTA180 (D2); AF90 (E1) e AF180 (E2); SF90 (F1) e SF180 (F2) cultivados com células FGH-1. Aumento de 500x.

APÊNDICE L – Fotomicrografias em MEV dos fragmentos radiculares tratados pelos diferentes agentes condicionadores e cultivados com células FLP, no período de 48 horas

Legenda: Imagens de MEV representativas de espécimes dos grupos AC90 (A1) e AC180 (A2); ACTC90 (B1) e ACTC180 (B2); TC90 (C1) e TC180 (C2); EDTA90 (D1) e EDTA180 (D2); AF90 (E1) e AF180 (E2); SF90 (F1) e SF180 (F2) cultivados com células FGH-1. Aumento de 500x.