UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

CARMEN EMILIA CABA PAULINO

**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**

BAURU
2014

CARMEN EMILIA CABA PAULINO

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 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 em Reabilitação Oral, linha de pesquisa Periodontia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Lúcia Rubo de Rezende

BAURU
2014

C111e Caba-Paulino, Carmen Emilia
Efeito do protocolo de desmineralização por ácido
citríco na área de superfície radicular recoberta por
fibroblastos do ligamento periodontal humano. Estudo à
microscopia eletrônica de varredura. – Bauru, 2014.
p. 95 : il. ; 31cm.

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Rubo de
Rezende

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
Protocolo nº: CAAE 23098313.1.0000.5417
Data: 27/11/2013

DADOS CURRICULARES

Carmen Emília Caba Paulino

04 de dezembro de 1984	Nascimento em San Francisco de Macorís, República Dominicana.
2003 - 2008	Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia da Universidade Autônoma de São Domingos (UASD), República Dominicana.
2010	Prática Profissionalizante junto à disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP).
2012 - 2014	Especialização em Periodontia na Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP).
2013	Curso de Prótese sobre Implante na Via Oral, Bauru, São Paulo.
2013	Curso de Aperfeiçoamento em Implantodontia na Associação Paulista de Cirurgião Dentista (APCD), Bauru, São Paulo.
2013	Curso de Aperfeiçoamento em Cirurgia Avançada na Associação Paulista de Cirurgião Dentista (APCD), Bauru, São Paulo.

DEDICATÓRIA

A minha família: muito especialmente a minha mãe **Amada del Carmen Paulino Honrado** e meu pai **Ramon Emilio de Jesús Caba Rodríguez** pelo imenso amor e apoio incondicional que sempre me oferecem, por cultivar a dedicação, a disciplina e o trabalho como guia da vida. Poder terminar este curso de mestrado é um exemplo de seus esforços e preocupação para que estudasse e recebesse uma boa educação durante toda minha vida. Por isso, vocês são meus principais educadores, que me ensinaram a caminhar na vida, a ser uma pessoa íntegra e a lutar por meus sonhos, minha gratidão e amor infinito para vocês. A meus irmãos: **Patricia Elisa Caba Paulino** e **Ramon Emilio Caba Paulino** pelo amor, amizade e cumplicidade que nos une, assim como o suporte durante todos estes anos fora de casa. Sou imensamente feliz de ter vocês na minha vida e dedico este trabalho a vocês que me apoiaram, ajudaram, incentivaram e sempre me acompanham em cada parte da minha vida. Vocês são minha maior benção, amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

A **nosso Senhor Jesus**: pelo dom da vida, a certeza de saber que é minha eterna companhia e por sempre fazer as coisas possíveis. Acredito que só com vosso amor e misericórdia os obstáculos e sacrifícios do dia a dia são mais toleráveis, chegando a converter-se em esforços sustentáveis que permitem alcançar nossos objetivos.

A **minha família**: meus pais **Amada del Carmen Paulino Honrado** e **Ramon Emilio de Jesus Caba Rodriguez**, agradeço muito todos seus esforços por educar e formar pessoas de bem para a sociedade como sempre nos falam, acredito que meus irmãos quanto eu somos exemplo de todos seus sacrifícios e trabalho de cada dia. Muito obrigada pela confiança, o apoio incondicional, o estímulo que sempre me oferecem. Também, pela oportunidade de estudar fora do nosso país e pelo otimismo de que tudo sairia bem no Brasil. Quero agradecer a meus irmãos **Patricia Elisa Caba Paulino** e **Ramon Emilio Caba Paulino**, por sempre acreditar e desejar o melhor para minha vida, para meus estudos e para que todos meus objetivos posam-se tornar uma realidade.

Aproveito para agradecer a meus avós **Ramona Rodriguez**, **Jesus Maria Caba** (in memoriam), **Ana Antonia Honrado** (in memoriam) e **Juan Júlio Paulino**, pelo amor, as orações e os desejos de que sempre cuidasse de mim e minha saúde. A minhas primas **Darilsa Caba**, **Vanessa Estevez** e **Evelissa Santos**, minha cunhada **Sthefania Taveras** e meu sobrinho **Ramon Emilio Caba Taveras**, pelo amor e apoio que me oferecem e por sempre ficar perto de mim sem importar a distância. A minha tia **Yocasta Caba** e a todos meus familiares paternos e maternos muito obrigada pelo carinho, desejos de bem-estar e sucesso para minha vida.

A minha madrinha **Carmen Collado**: por todo o imenso amor de mãe que recebo cada vez que compartilhamos, pelos conselhos, o apoio e a confiança, saiba que adoro a senhora e sinto muita gratidão por toda sua ajuda na minha vida.

A **Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB-USP)** e **Comissão de Pós-graduação**: na pessoa da diretora **Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado** e ao **Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti** respectivamente,

por permitir que alunos estrangeiros possam estudar nesta faculdade e pela oportunidade de realizar o programa de mestrado na linha de pesquisa em periodontia, nesta instituição tão importante para Brasil, América Latina e para o mundo.

Agradeço especialmente a minha orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Rubo de Rezende pela imensa dedicação, entrega, disponibilidade de tempo, ajuda e todas suas sugestões para a realização deste trabalho. Sinto muita admiração pelo ser humano que a senhora é, pelo seu compromisso e responsabilidade no seu trabalho, sempre tendo a vontade de fazer as coisas muito certas e com muito critério profissional. Desejo que Deus abençoe muito sua família quanto sua vida, que todos seus projetos continuem sendo muito sucedidos. Saiba que agradeço muito sua paciência e tolerância, pois orientar aluno estrangeiro não é coisa fácil, até por desconhecimento do próprio sistema da faculdade. Certamente consegui aprender muito com a senhora e esses ensinamentos sempre irão comigo. Por isso e muitas coisas mais meus sinceros agradecimentos!

A os professores do Departamento de Periodontia da FOB-USP: Prof. Dr. Sebastião Luiz Aguiar Gregghi, Prof^a. Dr^a. Adriana Campos Passanezi Sant'Ana, Prof^a. Dr^a. Carla Andreotti Damante e Prof^a. Dr^a. Mariana S. Ragghianti Zangrando: agradeço a colaboração e sugestões nas aulas, nos seminários e nas clínicas, compartilhando seus conhecimentos, suas filosofias de trabalho, as quais foram indispensáveis para minha formação acadêmica e o desenvolvimento do mestrado. Espero que durante meu exercício profissional, que agora vai começar, poder sempre lembrar de todo o aprendido com vocês e aplica-lo no meu país, República Dominicana. Muito obrigada por tudo, foi um honra conhecê-los e uma ótima experiência para minha vida ter estudado e aprendido periodontia com esta equipe.

Ao Prof. Dr. Euloir Passanezi, por ser um embaixador da periodontia da FOB e do Brasil, quem foi no meu país a difundir suas filosofias e através disso conheci a FOB e pensei na possibilidade de vir a fazer minha pós-graduação no Brasil. Muito obrigada pela sua gentileza, seus ensinamentos e disposição de trabalho. Foi uma honra receber aulas com uma pessoa de nível científica tão alto e ao mesmo tempo sendo tão humilde.

Da mesma forma, agradeço a **Prof^a. Dr^a. Carla Andreotti Damante** pela valiosa contribuição na realização desta pesquisa. Pelos aportes e a colaboração na fase experimental de todo o processo da cultura celular e da metodologia. Muito obrigada pela disposição de ajuda e o tempo de trabalho para que este estudo fosse uma realidade.

Também, a **Prof^a. Dr^a. Adriana Campos Passanezi Sant'Ana** pelos esclarecimentos das duvidas e na aplicação dos testes para a estatística desta pesquisa. Agradeço muito sua gentileza e seus aportes nesta pesquisa.

A os funcionários do Departamento de Periodontia da FOB-USP: especialmente a **Edilaine Lúcio Rodriguez Torrecilha** pela amizade, o carinho e a disposição de cooperar sempre que precisei, muito obrigada por tudo. **Também a Marcos Antonio de Godoy, Marcela Pereira e Ivânia Komatsu da Costa Arruda,** pelo tempo compartilhado e toda a ajuda recebida nestes anos do mestrado.

Ao **Prof. Dr. Vinicius Porto:** muito obrigada pela oportunidade de trabalhar nas despesas da área do Centro Integrado de Pesquisa (CIP) e disponibilizar todos os equipamentos necessários para a realização da fase da cultura celular deste experimento.

Ao **Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira:** por permitir que utilizássemos o Departamento de Bioquímica desta faculdade, para continuar com a fase experimental da pesquisa, especificamente a fixação das amostras. Meu agradecimento pela sua colaboração e sugestões que certamente tem enriquecido este trabalho.

Ao **Prof. Dr. Marco Antonio Húngaro Duarte:** agradeço toda sua ajuda no processo da microscopia eletrônica de varredura (MEV), a pesar de todos seus compromissos acadêmicos, conseguiu fazer um espaço na sua agenda e cooperar com esta pesquisa. Também, por dispor o microscópio eletrônico de varredura Aspex Express FEI, Endoven, Holand, obtido através da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) no processo numero 2012/06738-9.

Da mesma forma, ao técnico **Edimauro de Andrade** por nos auxiliar na fase da metalização de todas as amostras analisadas neste estudo, pelo sua disposição de trabalho e desejos de cooperar, minha gratidão para o senhor.

Ao **Prof. Dr. Alberto Consolaro**: por contribuir com a análise e descrição da morfologia celular deste trabalho. Meus agradecimentos pelos aportes, sugestões e pelo tempo que o senhor ofereceu para colaborar com esta pesquisa.

Ao **Rafael Ferreira**: devo dizer que sua contribuição foi muito valiosa, sua fé, bondade e desejos de ajudar fazem você uma pessoa de princípios e valores em via de extinção. Muito obrigada pela companhia e ajuda no experimento, sobretudo na fixação das amostras. Igualmente a **Paula Karam** pela colaboração no experimento, seja na preparação das soluções ou mesmo na parte técnica da fixação. Assim mesmo, a **Ruht Carvajal** e **Maria Alejandra Frias** por me ajudar na aplicação dos tratamentos aos espécimes. Desejo muito sucesso para suas vidas e exercício profissional, Deus abençoe vocês.

A meus companheiros do mestrado em Periodontia: **Maria Alejandra Medina Valdivia, João Paulo Barros, Adelina Mendes, Fabiola Azevedo e Paula Karam**: foi um prazer conhecer vocês, compartilhar as aulas e as clínicas do mestrado. Acredito que esta foi uma experiência muito enriquecedora para nossa formação como seres humanos e como profissionais, aprendi muito de nossa convivência. Aproveito para desejar muito sucesso para suas vidas e seu exercício profissional, assim como o doutorado, Deus os abençoe.

A meus companheiros do Departamento de Periodontia: **Roberta Domingues, Larissa Pessoa, Bruna Ferraz, Monica Ribeiro, Jorge Fiamengui, Maria Alejandra Frias, Issamarit Blanco, Jeffrey Rojas, Carlos Franco, Rafael Lara, Samira Salmeron, Lucas Cambiaghi, Renato Barros, Paula Cunha, Rebeca Martinez, Dolmarys Marquez, Indhira Nuñez, Payely Faña, Rodrick Arthur e Marianny Arthur**, pelo convívio diário, nas clínicas ou no departamento mesmo. Foi um prazer ter compartilhado e conhecido vocês, desejo muito sucesso em suas vidas e exercício profissional.

A meus amigos e amigas “Bauruenses”: pela amizade, o carinho e o apoio, vocês fizeram que estes anos fossem mais interessantes e divertidos quando teve a oportunidade de conhece-los e compartilhar com vocês. Especialmente a **Melisa Rodriguez e Yanelys Paulino**: nossa amizade transcende Bauru, pois desde a faculdade sempre me mostraram muito carinho, lealdade e amizade verdadeira, muito obrigada pelo apoio e ajuda incondicional, fico feliz porque além de amigas, são minhas irmãs. Também, a **Manuela Rodriguez**: por toda sua ajuda quando cheguei a Bauru, **Carolina Filpo, Felipe Pagán, Laysi Perez, Erika Kuriki, Max Laurent, Milena de Laurent, Juana Florian, Solanyi Rosario, Raysa Bautista, Alfredo Llerena Icochea, Karina Gautreaux, Roman Colon, Karina López, Yoira del Castillo, Gregorio Quezada, Sumaya Valenzuela, Issamarit Blanco, Maria Alejandra Frias, Rafaela Bonato, Jeffrey Rojas, Lida Velazque, Agueda Costa, Rafael Storino, Eliana Núñez, Edna Guzmán e Wilson Ogando**.

A meus amigos e amigas que a pesar de estar longe de casa sempre estão perto de mim: a **Justo Reyes** pelo incentivo de fazer mestrado e vir a estudar no Brasil e na FOB, seus conselhos e sugestões fizeram com que tomasse a decisão junto a meus pais de estudar aqui, agradeço muito toda sua motivação, apoio e confiança depositada em mim. Também, a **Ylsa Cepeda, Melai Chez, Dania Reyes, Glorivel Polanco, Carmen Luisa Cano, Genelio Garcia, Noemi Antonio, Lucidania Mejia, Michel Hernandez e Radhames Espinal**, pela amizade e o apoio, meu carinho e admiração por todos vocês.

A todos os professores e professoras que teve o prazer de receber aulas e que formam parte importante de minha formação: especialmente a **Prof. Dr. Waldyr Janson** (In memoriam), **Prof^a. Dr^a. Ana Capellozza, Prof^a. Dr^a. Silvia Sales Peres, Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria, Prof. Dr. Renato de Freitas, Prof. Dr. Daniel Resende, Prof^a. Dr^a. Aline Siqueira e o Prof. Dr. Arsenio Sales Peres**, por todos esses ensinamentos que passaram nas suas aulas, pela dedicação e o amor que tem pela educação.

Aos **alunos da graduação da FOB-USP**: por permitir que orientasse vocês nas clinicas, experiência muito enriquecedora, pois ensinando e ajudando vocês, aprendi muito do processo e de vocês mesmos. Isso fez com que meu curso de mestrado fosse mais interativo e interessante.

A todos aqueles **pacientes** que tive o privilégio de atender, com vocês aprendi clinicamente todo o que sei, meus agradecimentos pela oportunidade de adquirir experiência e contribuir com sua saúde. Além disso, agradeço a todos os pacientes que através da doação de seus dentes fizeram possível adquirir as amostras para este estudo. Assim como para todas aquelas pessoas que me ajudaram a conseguir os dentes, os estagiários da cirurgia, na especialização de periodontia e na graduação. Meus sinceros agradecimentos.

*“Nada te perturbe, Nada te espante,
Tudo passa, Deus não muda,
A paciência tudo alcança;
Quem a Deus tem, Nada lhe falta:
Só Deus basta.”*

Santa Tereza D'avila

RESUMO

A biomodificação radicular empregando ácido cítrico tem sido utilizada visando à reinserção dos tecidos periodontais a raízes expostas à doença periodontal. Entretanto, a grande diversidade metodológica entre os estudos ainda não possibilitou o estabelecimento de um protocolo amplamente aceito quanto à concentração e tempo de aplicação do ácido. Assim, 32 dentes extraídos por doença periodontal avançada forneceram 63 fragmentos radiculares que, após raspagem manual, foram divididos nos seguintes grupos de tratamento: Grupo AC-10-90: desmineralização com ácido cítrico a 10% em pH 1, durante 90 segundos; Grupo AC-10-120: desmineralização com ácido cítrico a 10% em pH 1, durante 120 segundos; Grupo AC-10-180: desmineralização com ácido cítrico a 10% em pH 1, durante 180 segundos; Grupo AC-50-90: desmineralização com ácido cítrico a 50% em pH 1, durante 90 segundos; Grupo AC-50-120: desmineralização com ácido cítrico a 50% em pH 1, durante 120 segundos; Grupo AC-50-180: desmineralização com ácido cítrico a 50% em pH 1, durante 180 segundos; Grupo C (controle): lavagem com soro fisiológico. Sobre as superfícies tratadas foram cultivados fibroblastos do ligamento periodontal humano por 24, 48 e 72 horas. A ampliação dos túbulos dentinários, morfologia celular e a porcentagem das superfícies radiculares recobertas por células foram avaliadas em microscopia eletrônica de varredura. As imagens microscópicas das superfícies recobertas por células foram comparadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn e na ampliação dos túbulos pelo teste de variância a dois critérios (ANOVA) complementado pelo teste de Tukey, em 5% de significância, ambos realizados por um programa computadorizado comparando os resultados entre os grupos. A exceção do grupo C, em todos os grupos houve aumento crescente da cobertura da superfície radicular por fibroblastos com o tempo. A maior área de cobertura foi apresentada pelo grupo AC-10-90 ($98,82 \pm 2,57\%$) às 24 horas e essa diferença foi significativa ($p < 0,001$) em comparação aos grupos AC-50-90 ($64,94 \pm 20,60\%$), AC-50-180 ($56,59 \pm 35,42\%$) e C ($0,06 \pm 0,24\%$). Nas demais comparações de tempo de aplicação e tempo de cultura, predominou a superioridade dos grupos tratados por ácido cítrico a 10% sobre os de 50%, porém, sem significância estatística. Todos os grupos teste foram significativamente superiores aos controle em todos os tempos de cultura. O menor valor médio para o diâmetro dos túbulos dentinários expostos pelos tratamentos foi apresentado pelo grupo AC-10-90 ($4,55 \pm 0,69 \mu\text{m}$) que diferiu significativamente ($p < 0,001$) dos grupos AC-10-120 ($5,33 \pm 0,95 \mu\text{m}$), AC-10-180 ($5,54 \pm 1,56 \mu\text{m}$) e AC-50-180 ($5,56 \pm 1,22 \mu\text{m}$). Esse último apresentou a

maior ampliação, porém sem diferença significativa em relação aos demais grupos. Os fibroblastos apresentaram-se mais espalhados, achatados e com menor definição de limites nos grupos tratados com ácido cítrico a 10% do que nos de 50%, cujas células apresentavam-se fusiformes e arredondadas. Concluiu-se que o ácido cítrico a 10% por 90 segundos produziu superfície mais favorável à proliferação celular com características morfológicas de estágios mais avançados de diferenciação e área de cobertura superficial por fibroblastos mais extensa no período inicial de cultura do que na concentração de 50%. A ampliação dos túbulos dentinários pareceu não influenciar a cobertura superficial por fibroblastos. Estudos subsequentes devem investigar a influência das propriedades químicas do agente biomodificador radicular para contribuir para a elucidação das diferenças produzidas no comportamento celular.

Palavras-chave: Ácido cítrico. Doença periodontal. Fibroblastos.

ABSTRACT

Effect of acid demineralization with citric acid on the root surface area covered by fibroblasts from the human periodontal ligament. Scanning electron microscopy study

The root biomodification employing citric acid has been used in order to reattach periodontal tissues to root surface exposed to periodontal disease. However, the methodological diversity among studies has not allowed the establishment of a widely accepted protocol as the concentration and time of acid application. Thus, 32 teeth were extracted due to advanced periodontal disease, so that 63 root fragments were provided. After scaling and root planning, the fragments were divided into the following treatment groups : AC-10-90 group: demineralization with 10% citric acid at pH 1 for 90 seconds; AC-10-120 group: demineralization with 10% citric acid at pH 1 for 120 seconds; AC-10-180 group: demineralization with 10% citric acid at pH 1 for 180 seconds; AC-50-90 group: demineralization with 50% citric acid at pH 1 for 90 seconds; AC-50-120 group: demineralization with 50% citric acid at pH 1 for 120 seconds; AC-50-180 group: demineralization with 50% citric acid at pH 1 for 180 seconds; group C (control) : rinsing with saline solution. On the treated surfaces, fibroblasts from human periodontal ligament were cultured by 24, 48 and 72 hours. The enlargement of the dentinal tubules, cell morphology and the percentage of root surface covered by cells were evaluated by scanning electron microscopy. Those microscopic images from the root surfaces covered by cells were compared by the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test and the enlargement of tubules by two variance (ANOVA) complemented by the Tukey test, both performed by a computer program comparing the results between the groups, at 5% significance. With the exception of group C, all groups showed increasing coverage of the root surface by fibroblasts over time. The largest area of coverage was presented by AC-10-90 ($98.82 \pm 2.57\%$) at 24 hours and this difference was significant ($p < 0.001$) compared to AC-50-90 ($64.94 \pm 20.60\%$), AC-50-180 ($56.59 \pm 35.42\%$) and C ($0.06 \pm 0.24\%$). In other comparisons the application time and culture time groups treated with citric acid at 10% were superior to groups of 50%, without statistical significance. All test groups were significantly better than the control ones at all times of culture. The shortest average diameter of dentinal tubules exposed by the treatments was presented by AC-10-90 ($4.55 \pm 0.69 \mu\text{m}$) group that

differed significantly ($p<0,001$) from AC-10-120 (5 groups $33\pm0.95\ \mu\text{m}$), AC-10-180 ($5.54\pm1.56\ \mu\text{m}$) and AC-50-180 ($5.56\pm1.22\ \mu\text{m}$). This last showed the highest enlargement, but without significant difference compared to the other groups. The fibroblasts were more spread, flattened and had less identifiable limits in the groups treated with citric acid 10% than those in 50% which cells had become rounded and spindle. It was concluded that the demineralization with 10% citric acid for 90 seconds produced more favorable surface to cell proliferation, more morphological characteristics of later stages of differentiation and larger surface area coverage by fibroblasts in the initial periods of culture than any of the groups treated with 50% citric acid. The enlargement of dentinal tubules did not seem to influence the surface coverage by fibroblasts. Subsequent studies should investigate the influence of the chemical properties of the root conditioner agent on the root surfaces in order to contribute to the elucidation of the differences produced in the cell behavior.

Keywords: Citric acid. Periodontal disease. Fibroblasts.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1** - Identificação da superfície radicular a ser tratada. A: Região radicular desprovida de remanescentes de ligamento periodontal (colchete); B: Confecção de sulcos superficiais com broca diamantada para identificação da área de trabalho; C: Superfície de trabalho delimitada..... 42
- Figura 2** - Preparo das áreas de trabalho nas amostras. A: Divisão em terços da área de trabalho; B: Raspagem e alisamento radicular do dente, em sentidoápico-coronal; C: Secção transversal do dente com disco diamantado; D: Separação dos fragmentos mesial e distal das raízes. 42
- Figura 3** - Cultura primária das células do ligamento periodontal. A: Imagem no microscópio de fase da cultura primária, onde se observam o explante e as células do ligamento periodontal. 44
- Figura 4** - Fotomicrografia com grade superposta pelo programa analisador de imagens. A: Um campo de 300x300 pixel, no qual foi superposta uma grade constituída de quadrados de 4225 pixel² de área; B: Quadro indicado pela seta ampliado para medir em micrometros o diâmetro dos túbulos dentinários completamente expostos. 46
- Figura 5** - Fotomicrografia de um espécimen. A: Fotomicrografia com células FLPH sobre a superfície radicular; B: Fotomicrografia com células FLPH delimitadas com ajuda do programa Image J..... 46
- Figura 6** - Camada de reprecipitação sobre a superfície radicular. A: Espécime do grupo AC50-120 (1M); B: Espécime do grupo AC50-180 (3C1) com obliteração dos túbulos dentinários. É possível observar em A presença de um prolongamento citoplasmático celular (seta). 52
- Figura 7** - Fotomicrografias eletrônicas de varredura dos espécimes tratados com ácido cítrico a 10%. A, B e C correspondem respectivamente aos grupos AC10-90, AC10-120 E AC10-180
-
-

às 24 horas de cultura. De D a F, os mesmos grupos às 48 horas de cultura e de G a I, os mesmos grupos às 72 horas em cultura. Observa-se que às 24 horas há uma monocamada celular recobrimdo grande parte da superfície (de A a C). As 48 e 72 horas, os FLPH arranjam-se em multicamadas com cobertura praticamente total das superfícies (de D a I). As setas identificam alguns contornos celulares. 55

Figura 8 - Fotomicrografias eletrônicas de varredura dos espécimes tratados com ácido cítrico a 50%. A, B e C correspondem respectivamente aos grupos AC50-90, AC50-120 E AC50-180 às 24 horas de cultura. De D a F, os mesmos grupos às 48 horas de cultura e de G a I, os mesmos grupos às 72 horas em cultura. Observa-se que às 24 horas há poucas células distribuídas sobre uma superfície aparentemente recoberta por uma camada de precipitação (A e B). As células apresentam morfologia fusiforme ou arredondada com poucos prolongamentos citoplasmáticos ou filopodia, sem comunicação umas com as outras. Às 48 horas, uma monocamada celular mais homogênea com células mais achatadas e conectadas umas às outras era vista nos espécimes de 90 segundos de aplicação do ácido (D), mesmo em áreas de precipitação, como no espécime de 120 segundos visto em E, ou de grande ampliação de túbulos dentinários como o de 180 segundos visto em F. Em G observa-se um espécime de 72 horas do grupo AC50-90 onde uma monocamada de FLPH cobre quase toda a superfície. Em H é vista uma área de grande ampliação e desobstrução dos túbulos dentinários sobre a qual uma monocamada irregular de FLPH é formada por células fusiformes, alongadas, tendendo ao achatamento e à comunicação intercelular. Em I, por sobre uma superfície de precipitação que pode ser vista por transparência, as células se superpõem formando mais de uma camada. As setas identificam alguns contornos celulares..... 59

Figura 9 - Fotomicrografias eletrônicas de varredura dos espécimes do grupo controle. A figura A corresponde a um espécime de 24 h de cultura; B, um espécime de 48 h e C, um espécime de 72 h. Observam-se poucas células recobrimdo as superfícies (setas). Às 72 horas, os FLPH parecem estar “mais espalhados” com cobertura escassa sobre a superfície (C)..... 61

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Ampliação dos túbulos dentinários (μm) após desmineralização com ácido cítrico a 10% e 50%..... 51
- Tabela 2** - Porcentagem de área de superfície radicular recoberta por FLPH nos diferentes tempos de cultura, concentrações do ácido cítrico e tempos de aplicação do ácido..... 53
-
-

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AC	Ácido cítrico
ANOVA	Análise de variância
Co	Companhia
CO ₂	Dióxido de carbono
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
DMEM	Meio de cultura Dulbecco modificado de Eagle
EDTA	Ácido Etileno-Diamino Tetra-acético
FAPESP	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
FLPH	Fibroblastos do ligamento periodontal humano
°C	Graus célsius
HCL	Tetraciclina ácida
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
µm	Micrômetro
Min	Minuto
Mm	Milímetro
Mg	Miligrama
ml	Mililitro
M	Mol
pH	Potencial de hidrogênio
PP-H	Proteínas altamente fosforiladas
RAR	Raspagem e alisamento radicular
Rpm	Revoluções por minuto
S	Segundos
SFB	Soro fetal bovino
St	Saint
UI	Unidade Internacional
USA	United State of America
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
$\geq$	Maior ou igual
$<$	Menor
$\pm$	Más/menos
x	Vezes
²	Quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1	EFEITOS SOBRE A ESTRUTURA SUPERFICIAL RADICULAR.....	29
2.2	EFEITO DO CONDICIONAMENTO ÁCIDO RADICULAR SOBRE O COMPORTAMENTO DE FIBROBLASTOS EM CULTURA	32
3	PROPOSIÇÃO.....	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	SELEÇÃO E OBTENÇÃO DA AMOSTRA.....	41
4.2	PREPARO DAS AMOSTRAS	41
4.3	CULTURA DE FIBROBLASTOS DO LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO (FLPH).....	43
4.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	44
4.5	ANÁLISE QUANTITATIVA.....	45
4.6	ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	47
4.7	ANÁLISE DOS RESULTADOS	47
5	RESULTADOS	49
5.1	ANALISE QUANTITATIVA.....	51
5.2	ANALISE QUALITATIVA.....	53
6	DISCUSSÃO	63
7	CONCLUSÕES.....	71
	REFERÊNCIAS.....	75
	APÊNDICES	83
	ANEXOS.....	89

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A Academia Americana de Periodontologia (2001) preconiza que a remoção de depósitos bacterianos, detenção da progressão da doença periodontal e a regeneração dos tecidos perdidos pelo processo da doença constituem-se no objetivo ideal e principal da terapia periodontal. A obtenção de biocompatibilidade radicular é um requisito importante na busca desse objetivo.

Estudos ultraestruturais comprovam que ocorrem alterações no cimento radicular exposto à doença periodontal, incluindo a impregnação por endotoxinas (ALEO et al., 1974, HATFIELD; BAUMHAMMERS, 1971) e antígenos (ALEO et al., 1975) de origem bacteriana que inibem a inserção celular (ARMITAGE et al., 1973), além de elevação das concentrações de cálcio, fósforo e flúor, as quais produzem uma camada superficial altamente mineralizada (BILGIN et al., 2004, SELVING; HALS, 1977) com espessura mais fina do que em condições de saúde (GUPTA et al. 2013). As superfícies assim alteradas representam um reservatório de bactérias (NANCI; BOSSHARDT, 2006) e seus produtos (GRZESIK; NARAYANAN, 2002) e sobre elas frequentemente há lacunas de reabsorção colonizadas por periodontopatógenos (BIMSTEIN et al., 1998, KINA et al., 2008, ADRIAENS; ADRIAENS, 2004).

Tais alterações resultam na inibição do crescimento e inserção dos fibroblastos (BILGIN et al., 2004) e inflamação persistente impossibilitando a erradicação da doença (ALEO et al., 1974, HATFIELD; BAUMHAMMERS., 1971), e prejudicando o reparo das estruturas de suporte perdidas durante a progressão da doença (GRZESIK; NARAYANAN, 2002). Por essa razão, tem-se aceitado que existe necessidade de realizar procedimentos de biomodificação radicular com o intuito essencial de eliminar a contaminação superficial da dentina e cimento radicular e, assim, promover uma superfície clinicamente lisa, dura, biologicamente limpa e receptiva a elementos celulares e à inserção de fibras colágenas, essencial para a regeneração tecidual (VERMA; GOHIL, 2012, BAKER et al. 2000).

Os efeitos da desmineralização com ácido cítrico associado à raspagem de raízes periodontalmente doentes sobre fibroblastos do ligamento periodontal humano e sobre a organização de fibras colágenas a essas raízes resultaram em inserção celular tanto em dentina como em cimento (HIGASHI et al., 1995). Entretanto, a desmineralização por ácido cítrico pH 1 por 3 min produziu inserção perpendicular de fibrilas colágenas às superfícies, o que

pode indicar que a aplicação tópica de ácido cítrico sobre superfícies radiculares durante cirurgias periodontais pode encurtar a sequência biológica dos eventos de reparação (HIGASHI et al., 1995).

A raspagem e alisamento radiculares são os procedimentos mais amplamente executados com o objetivo de promover superfícies radiculares biocompatíveis. Entretanto, invariavelmente, uma camada de *smear layer* resulta dos procedimentos de raspagem (ALEO et al., 1974, POLSON, 1984), a qual funciona como barreira física que inibe a adesão, a migração e a proliferação celular sobre a superfície radicular (BLOMLÖF; BLOMLÖF; LINDSKOG, 1997). Por outro lado, foi demonstrado que o emprego de agentes químicos desmineralizantes são capazes de eliminar a *smear layer* resultante da raspagem (MINOCHA et al., 2014, AMARAL et al., 2011), promover a cementogênese (MARIOTTI, 2003), além de manter uma estrutura de fibrina aderida à raiz que serve de arcabouço para a migração de fibroblastos (BAKER et al. 2000) e para a formação de nova inserção de tecido conjuntivo, nos procedimentos de regeneração em seres humanos (MARIOTTI, 2003).

Existe profusão de publicações quanto a diferentes tipos de biomodificadores radiculares químicos, sendo o ácido cítrico considerado o agente de maior efetividade na remoção da *smear layer*, na exposição das fibras colágenas e na abertura completa dos túbulos dentinários (MINOCHA et al., 2014, CAVASSIM et al., 2012., FONTANARI et al., 2011, AMARAL et al., 2011, PRASAD et al., 2012, ABED et al., 2013). Também tem sido demonstrado que o tratamento com ácido cítrico produz maior adesão e proliferação de fibroblastos do ligamento periodontal humano sobre as raízes (FARDAL; LOWENBERG, 1990, ROMPEN et al., 1999), assim como absorção e adesão de rede de fibrina contendo elementos celulares como eritrócitos e plaquetas, importantes para o reparo dos procedimentos cirúrgicos periodontais (AMIREDDY et al., 2011., BAKER et al., 2000) em comparação a outros agentes condicionantes.

Aparentemente, existe certa influencia do pH do agente biomodificador sobre a capacidade de remoção da *smear layer* das superfícies radiculares. Foi verificado que a tetraciclina HCl em pH 1,6 e ácido cítrico em pH 1 removem melhor a *smear layer* em comparação à doxiciclina em pH 2,2 (CHAHAL et al., 2014). Além do pH, os estudos variam amplamente as concentrações dos diferentes tipos de agentes, o que dificulta a comparação entre dados de diferentes publicações. O ácido cítrico, por exemplo, tem sido empregado em concentrações de 25% (FONTANARI et al., 2011, CAVASSIM et al., 2012), 50%

(AMARAL et al. 2011., BARROS., 2013) e como solução saturada (BABAY., 2001, BAKER et al. 2005, CHAHAL et al. 2014).

Existe ainda, ampla diversificação quanto ao tempo de aplicação das substâncias sobre as raízes, de forma que a aplicação do ácido cítrico pode variar entre 20 s, 1 min e até 5 min de duração (CAVASSIM et al., 2012, SHETTY et al., 2008, MARIOTTI., 2006). Resultados de estudo prévio da equipe de pesquisadores da Disciplina de Periodontia da FOB-USP demonstraram que após 90 segundos de aplicação, agentes como EDTA 24%, ácido cítrico 50% pH 1 e ácido cítrico 50% pH 1 associado a tetraciclina a 50% são suficientes para descontaminação da superfície radicular, favorecendo o crescimento celular (BARROS., 2013).

Por outro lado, a validade clínica do condicionamento ácido radicular tem sido questionada devido a inconsistências verificadas entre estudos *in vitro* e *in vivo*, atribuídas a divergências na calibração dos examinadores, na ausência de grupo controle, ao tamanho reduzido da amostra, assim como a variações na concentração do ácido empregado, no tempo de aplicação, no pH, na duração do estudo, entre outras causas (MARIOTTI., 2003).

Parece que está estabelecido que, para que ocorra reinserção de fibras colágenas do tecido periodontal às raízes previamente doentes, é necessário inicialmente, que fibroblastos povoem essas superfícies. Do contrário, um epitélio juncional longo se desenvolverá (GAMAL; MAILHOT., 2000). Também foi previamente demonstrado que a migração, inserção celular e inserção de fibrina à superfície radicular são processos essenciais para a formação de fibras orientadas nessa superfície (POLSON; PROYE., 1983). O comportamento de fibroblastos cultivados sobre superfícies radiculares que sofreram diferentes tipos de tratamento quanto à área de extensão das células aderidas e quanto à sua morfologia tem sido bastante estudado para caracterizar os fenômenos biológicos que ocorrem no início da cicatrização periodontal em diferentes situações, tendo sido encontrados exemplos de que este método pode ter relevância e correlação com resultados clínicos na aplicação de fatores de crescimento (BELAL et al., 2006) e de laser (BELAL et al., 2007) sobre as raízes, para estudar o efeito do tabagismo na aderência celular (GAMAL; BAYOMY., 2002), para comparar raspagem manual e ultrassônica (KHOSRAVI et al., 2004) e também para comparar diferentes tipos de condicionamento químico radicular (ZAMAN et al., 2000). Entretanto, não foram encontrados estudos comparando protocolos de concentração e tempo de aplicação de

ácido cítrico, como os propostos nesta dissertação, com respeito ao comportamento de fibroblastos extraídos de ligamento periodontal humano.

Assim, objetivou-se investigar como e se a variação da concentração do ácido cítrico em pH 1 e o tempo de duração da desmineralização afetam o comportamento de fibroblastos do ligamento periodontal humano em cultura quanto à área de cobertura superficial por essas células.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

Embora o ácido cítrico seja amplamente empregado para biomodificação radicular em Periodontia, sua concentração e pH poucas vezes foram alvos de análises comparativas tanto dos efeitos sobre a estrutura superficial e ampliação de túbulos dentinários, quanto sobre a adesão e comportamento celular sobre as superfícies biomodificadas.

2.1 Efeitos sobre a estrutura superficial radicular

Um dos primeiros estudos a verificar o efeito de concentrações crescentes de ácido cítrico sobre dentina radicular foi o de Sterret et al. (1993) em dentes bovinos. Foram comparadas as concentrações de 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 65%, em pHs de 1.95, 1.77, 1.62, 1.55, 1.46, 1.37, 1.01 respectivamente nos tempos de aplicação de 1, 2, 3 minutos. Verificou-se que existe uma concentração ideal de ácido cítrico (25-30% em 2-3 minutos de aplicação) acima da qual a desmineralização da dentina diminui. Ocorreram picos de desmineralização no tempo de 1 minuto para a concentração de 30% (pH = 1.55) e em 2 e 3 minutos para a concentração de 25% (pH=1.62), havendo uma linearidade temporal da desmineralização.

Como o ácido cítrico tem efeito quelante sobre íons cálcio, o conteúdo desse mineral no tecido interfere no potencial desmineralizante do ácido (HENNEQUIN; PAJOT; AVIGNANT., 1994). O grau de mineralização radicular, por sua vez, é dependente da região do dente em questão (STEINFORT; DEBLAUWE; BEERTSEN., 1990) e do tempo de exposição ao ambiente oral (FONTANARI et al., 2011). Assim, Hennequin; Pajot; Avignant (1994) estudaram o efeito do ácido cítrico aplicado por 2 minutos em diferentes concentrações (5%, 10%, 20%, 30% e 50%) e valores de pH (0,8, 1,1, 1,3, 1,5 e 1,7) sobre a capacidade de remoção de Ca e P de amostras de dentina removidas de diferentes regiões radiculares (cervical, média e apical). Verificaram que o conteúdo mineral diminuiu do terço cervical para o apical e que quanto mais alta é a concentração do ácido, maior quantidade de Ca é removida das raízes igualmente em qualquer dos terços radiculares considerados. A maior perda de Ca foi a produzida pelo pH 1,1. Por outro lado, a concentração do ácido não aumentou sua capacidade de desmineralização. A hipótese dos autores para justificar essa

observação baseou-se na possibilidade da ocorrência das seguintes reações químicas: a dissolução da fase mineral da dentina a partir de um determinado pH, poderia resultar na formação de soluções de citrato de cálcio e fosfato de cálcio, a partir dos quais haveria uma reprecipitação da hidroxiapatita sobre a superfície desmineralizada. Participariam desse processo fosfoproteínas altamente fosforiladas (PP-H) resultantes da exposição da matriz colágena da dentina. Essas PP-Hs deixadas pela desmineralização podem induzir a formação de hidroxiapatita a partir de soluções de fosfato de Ca. Assim, altas concentrações de ácido exporiam mais PP-H, justificando o porquê de concentrações mais altas não terem melhorado o condicionamento radicular. Esse argumento foi inclusive usado para explicar os resultados conflitantes a respeito do condicionamento com ácido cítrico de raízes em periodontia, frente à inexistência de um procedimento rigorosamente padronizado para preparar a solução de ácido cítrico. Sugeriram ainda a realização de estudos nos quais fosse avaliada a interferência da camada de reprecipitação de apatita após o condicionamento com agentes de baixo pH e altas concentrações, sobre a quimiotaxia e inserção de células do ligamento periodontal às superfícies radiculares desmineralizadas.

Por outro lado, não só a região radicular, mas o tempo de exposição da raiz ao ambiente oral influencia o grau de mineralização radicular e, consequentemente, a desmineralização, como demonstraram Fontanari et al., (2011). Esses autores avaliaram o potencial desmineralizante de diferentes concentrações de agentes químicos biomodificadores em raízes expostas ou não ao ambiente oral e, para facilitar a análise, propuseram um sistema de escores relativos à capacidade de remover a *smear layer* e expor as fibras colágenas das superfícies radiculares como se segue: escore 1 = ausência de *smear layer* e exposição de fibras colágenas da dentina ou cimento; escore 2 = abertura parcial dos túbulos dentinários, sem exposição de fibras colágenas; escore 3 = presença de *smear layer*; e escore 4 = presença de *smear layer* formada pela dissolução química da superfície. Demonstraram que a capacidade de desmineralização do ácido cítrico depende de sua concentração. A maior frequência de escore 4 foi encontrada para o ácido cítrico a 25% aplicado por 3 min, enquanto que o escore mais alto apresentado para o ácido cítrico a 1% por 1 minuto foi 2. Entretanto, em raízes hipermineralizadas, o ácido cítrico a 1% não foi eficiente na desmineralização. Ao compararem esses resultados com os de dentes não irrompidos, verificaram que são mais facilmente desmineralizados, chegando o ácido cítrico a 25% a causar hiperdesmineralização desses dentes. Recomendaram, então, que sejam evitadas altas concentrações do ácido, já que elas podem resultar em completa dissolução da superfície radicular.

Haznedaroğlu (2003) também chegou a conclusão semelhante ao testar concentrações de 50%, 25%, 10% e 5% de ácido cítrico (peso por volume) em pH “original” (aquele naturalmente resultante da preparação), ou tamponado (pH = 6) aplicados por 2 minutos em 50 raízes saudáveis recém-extraídas. As soluções de ácido cítrico com pHs variando entre 1,1 e 1,9 foram mais efetivas na remoção total da smear layer, mas nas concentrações de 5% e 10% em pH 6, a remoção da smear layer foi incompleta, o que o levou a considerar que o pH é mais influente nesse aspecto do que a concentração do ácido. Embora tenha havido remoção eficiente de smear layer nas concentrações de 25% e 50% em ambos os pHs, as de pH baixo causaram maior destruição de dentina peritubular. Por esta razão, também recomendou o emprego de concentrações mais baixas do ácido.

Um efeito erosivo da superfície radicular com concentrações mais altas e maior tempo de aplicação do ácido cítrico foram observados por Reis et al. (2008), ao compararem três concentrações diferentes de ácido cítrico (1%, 5% e 10%) aplicado sobre dentina radicular durante 15 a 300 segundos. O efeito quelante foi proporcional à concentração, mas houve ocorrência de erosão após o tempo de 60 segundos de aplicação do ácido a 10%. Ainda nessa concentração, após 30 segundos de aplicação, não houve remoção completa de smear layer. De forma geral, as concentrações mais baixas e com pH baixo foram mais efetivas do que concentrações e pHs altos que causaram mais destruição da dentina intertubular. Comentaram a falta de padrão de preparo das soluções ácidas usadas nas publicações, o que pode gerar inconsistência de resultados.

Considerando que o baixo pH e alto poder desmineralizante do ácido cítrico poderia potencialmente lesar tecidos, tem havido a preocupação quanto à manutenção da estrutura do colágeno dentinário após a desmineralização. Foi comprovado, através de imunohistoquímica, que as características bioquímicas do colágeno e do sulfato de condroitina permanecem preservadas em fragmentos de dentina radicular exposta à doença periodontal condicionadas com ácido cítrico a 10% por 2 minutos (RUGGERI et al., 2007). Entretanto, na busca de parâmetros de concentração, tempo e modo de aplicação, 5 diferentes concentrações do ácido cítrico (15%, 20%, 25% e 30%) foram estudadas por Cavassim et al. (2011) que obtiveram melhores resultados quanto à exposição de fibras colágenas com o ácido cítrico a 25% brunido por 3 minutos nas superfícies, embora sem diferença estatística em relação a outras combinações de concentração e tempo de aplicação. Como verificaram destruição de fibras colágenas ao invés de preservação com as concentrações mais altas, diminuíram a

concentração do ácido para 0,5, 1 e 2%, mas não encontraram diferenças nos resultados, verificando excessiva desmineralização radicular até com essas concentrações mais baixas

Poucos estudos foram encontrados na literatura recente sobre o diâmetro dos túbulos dentinários resultantes da desmineralização com ácido cítrico. No estudo de Shetty et al. (2008), o ácido cítrico saturado em pH 1 foi brunido por 5 minutos (trocando a bolinha de algodão a cada 30 segundos) sobre a superfície de raízes periodontalmente doentes, resultando em diâmetro médio dos túbulos dentinários de $1.33 \pm 0,02 \mu\text{m}$.

Porém, Abed et al. (2013) desmineralizaram raízes de dentes saudáveis com ácido cítrico a 3% por 3 minutos por brunidura (trocando a bolinha de algodão a cada 30 segundos) e verificaram diâmetro de aproximadamente $3 \mu\text{m}$ dos túbulos dentinários. Em 1992 também Labahn et al. já haviam chegado ao diâmetro de $3,18 \mu\text{m}$ dos túbulos dentinários após a desmineralização com solução saturada de ácido cítrico por 4 minutos em raízes não expostas à doença periodontal. Nenhum desses dois trabalhos especificou o pH da solução ácida empregada.

2.2 Efeitos do condicionamento ácido radicular sobre o comportamento de fibroblastos em cultura

Está bem documentado que os fibroblastos humanos apresentam comportamento alterado pela presença de contaminação radicular e que essa alteração resulta na perda de quimiotaxia e de adesão dessas células à superfície radicular (ALEO et al., 1975). Sobre superfícies radiculares saudáveis, Al-Nazhan et al. (2004) verificaram à microscopia eletrônica de varredura que fibroblastos originários do ligamento periodontal humano apresentam-se inseridos à superfície dentinária já após 24 horas de cultura. Morfologicamente, as células apresentavam-se discoides e com superfície lisa, além de estarem bem espalhadas e com partes da filopodia inserindo-se no interior de túbulos dentinários. À medida que o tempo avançou, as células tornaram-se mais espalhadas e inseridas no substrato. O livre espalhamento celular e a penetração das extensões citoplasmáticas nos túbulos dentinários foram enfatizados pelos autores como fator de estabilização dos fibroblastos à superfície e imprescindíveis para a função celular.

Por outro lado, fibroblastos cultivados sobre superfícies radiculares contaminadas apresentaram um crescimento celular desordenado e citoplasma irregular (BIAGINI et al., 1992), características essas que podem ser revertidas pelo condicionamento ácido, como demonstraram Zaman et al. (2000). Esses autores avaliaram qualitativamente, empregando microscópio de contraste de fase, a migração, inserção e orientação de células do ligamento periodontal humano sobre cimento e dentina de dentes periodontalmente comprometidos após imersão por 3 minutos em diferentes condicionadores de pH baixo e neutro: solução saturada de ácido cítrico pH 1,20; EDTA a 24% com pH 7,04; tetraciclina 100mg/ml com pH 2,00. Espécimes tratados apenas com raspagem serviram como controle. Após 1, 3 e 7 dias, os resultados não mostraram diferenças estatísticas entre os métodos de desmineralização no índice de inserção e orientação das células. Apesar disso, houve uma significativa inserção e orientação de fibroblastos do ligamento periodontal em dentina e cimento quando tratadas com EDTA e ácido cítrico no primeiro dia, com superioridade do ácido cítrico quando as células foram cultivadas em cimento. Atribuíram esses resultados à exposição de proteínas e fatores de crescimento do cimento importantes para a regeneração periodontal, razão pela qual defenderam que o cimento não deve ser todo raspado, mas sim mantido parcialmente durante a raspagem para que essas substâncias não sejam completamente eliminadas.

Fibroblastos gengivais humanos também foram cultivados por Babay (2001) por 72 horas sobre raízes periodontalmente comprometidas raspadas e condicionadas por ácido cítrico (pH 1) por 3 minutos, para posterior análise à microscopia eletrônica de varredura. Foi verificado espalhamento das células recobrando totalmente a superfície radicular, diferentemente do que ocorreu em raízes não desmineralizadas. Esse comportamento também foi produzido pela tetraciclina hidrocloreada (pH 1,8) e por EDTA (8%, pH 7,3) nas mesmas condições. O autor relacionou esses resultados à exposição de constituintes da matriz extracelular na superfície que agiriam sobre os mecanismos de inserção dos fibroblastos e a um efeito indireto que seria o criado pela rugosidade de superfície resultante da desmineralização.

Mais tarde, Chandra; Jagetia; Bhat (2006) cultivaram fibroblastos do ligamento periodontal humano por 4 semanas sobre superfícies radiculares previamente doentes tratadas com ácido cítrico (pH 1) friccionado durante 5 minutos e verificaram que as células se espalharam assumindo aparência de “ovo frito” e com vilosidades e filopodias. Sobre raízes não tratadas, as células apresentavam aparência não saudável, com bolhas na sua superfície, fenestrações e micro-ondulações, com ausência de extensões citoplasmáticas e distribuição

esparsa. As superfícies radiculares não tratadas apresentavam smear layer e falta de exposição de colágeno, o que consideraram desfavorável para o crescimento celular. Nesse estudo, a maioria das células estava relacionada à presença de túbulos dentinários e à malha de colágeno exposta pela desmineralização e esses resultados foram melhores para o ácido cítrico em comparação ao EDTA e tetraciclina, que foram outros agentes usados pelos autores. Ressaltaram que as células que se aderiram às superfícies condicionadas não apresentavam lamelopodias, o que indicaria que elas já teriam encontrado substrato ideal e pararam de migrar.

Entretanto, preocupados com a possibilidade de que o baixo pH das soluções ácidas empregadas em biomodificação radicular pudesse ser tóxico para o tecido em caso de contato direto com o periodonto, Lan et al. (1999) estudaram os efeitos da acidose extracelular produzida pelo ácido cítrico sobre a viabilidade, síntese proteica e atividades de inserção de fibroblastos gengivais humanos. Observaram que na concentração de 47,6 mmol/L de água, o ácido cítrico (pH 2,3) produziu morte total de fibroblastos gengivais humanos em cultura dentro de 3 minutos de incubação, mas a citotoxicidade já foi vista a partir de 23,8 mmol/L (pH 6,3), com efeitos inibidores da síntese proteica pelas células dentro de 3 horas de incubação. Quando a concentração foi de apenas 11,9 mmol/L (pH 7,5) houve supressão da inserção e espalhamento de fibroblastos em placas de cultura. Perceberam ainda, que a maior parte das mortes celulares poderia ser prevenida ajustando o pH do meio de cultura para 7,5. Por esta razão, advertiram que ao empregar soluções de baixo pH em periodontia, seja tomado cuidado para que os tecidos moles não sejam atingidos, que o ácido seja totalmente lavado após o condicionamento e que a concentração e tempo de aplicação do ácido sejam controlados.

A preocupação com a viabilidade celular foi manifestada também por Rompen et al. (1999), mas em relação a fibroblastos derivados do ligamento periodontal humano cultivados sobre pó de dentina desmineralizada por 3 minutos com ácido cítrico a 3% (pH 1,85) ou minociclina hidrocloreada a 2,5% (pH 3,8). Observaram que os dois agentes condicionantes resultaram em bom potencial proliferativo e atividade biossintética das células que se apresentavam com lamelopodias e filopodias penetrando dentro dos túbulos dentinários, o que sugeriram refletir migração direta das células em direção às substâncias quimiotáticas. Embora quanto à proliferação e atividade biossintética os dois condicionantes não tenham apresentado diferenças significantes, o ácido cítrico produziu morfologia celular de melhor espalhamento e achatamento das células às superfícies do que a minociclina.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo se propôs a comparar o efeito da biomodificação radicular com ácido cítrico nas concentrações de 10% e 50% em pH 1, durante 90, 120 e 180 segundos, na área de superfície recoberta por fibroblastos do ligamento periodontal humano cultivados sobre fragmentos de raízes de dentes extraídos por doença periodontal.

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção e Obtenção da Amostra

Foram empregados 32 dentes recém-extraídos por doença periodontal avançada e três sem doença periodontal extraídos por indicação cirúrgica e expressamente doados por pacientes da Clínica de Periodontia e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP). Foi obtido termo de consentimento livre e esclarecido, assim como termo de doação de dentes, de todos os pacientes antes da extração. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOB-USP (CAAE 23098313.1.0000.5417).

Os critérios de inclusão dos dentes extraídos por doença periodontal no estudo foram: perda de inserção proximal ≥ 7 mm comprovada radiograficamente e por sondagem com sonda periodontal milimetrada; sangramento à sondagem; não terem sofrido raspagem radicular nos 6 meses prévios ao início do estudo; ausência de cáries e fraturas ou anormalidades nas superfícies radiculares.

Os três dentes saudáveis foram extraídos por encontrarem-se não irrompidos e impactados e serviram para obtenção de fibroblastos do ligamento periodontal humano (FLPH) para cultura.

4.2 Preparo das Amostras

Os dentes recém-extraídos foram acondicionados em frascos individuais contendo soro fisiológico estéril e armazenados a 4° C por até 4 meses antes de serem utilizados na pesquisa. Nesses dentes, as superfícies radiculares expostas à doença periodontal foram identificadas com lupa a 4 vezes de ampliação como sendo as áreas com ausência de remanescentes do ligamento periodontal (Figura 1A). As faces proximais dos dentes foram escolhidas por apresentarem superfície mais plana e regular do que as faces vestibular e lingual visando facilitar os procedimentos para cultura de células. O segmento radicular escolhido recebeu sulcos transversais e axiais com broca diamantada tronco-cônica em alta rotação sob refrigeração, delimitando um quadrilátero de aproximadamente 4 mm x 2 mm (Figuras 1B e C), com a finalidade de identificar e limitar a área a receber raspagem manual. Esta região foi dividida em terços para execução da raspagem manual.

Figura 1 - Identificação da superfície radicular a ser tratada. A: Região radicular desprovida de remanescentes de ligamento periodontal (colchete); B: Confeção de sulcos superficiais com broca diamantada para identificação da área de trabalho; C: Superfície de trabalho delimitada

A raspagem foi efetuada por um único profissional experiente (C.E.C.P.) com movimentos em sentido ápico-coronal (Figura 2A) em cada terço da superfície delimitada, empregando 20 golpes (RUBO, 1989) de cureta de Gracey 5-6, (Hu-Friedy, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) estéril, sendo que o instrumento foi afiado ao final de cada sequência de 20 golpes. Em seguida, a superfície radicular raspada foi separada da coroa e da parte saudável da raiz com um disco diamantado (Figura 2 A-C) e, em seguida, as secções radiculares transversais foram separadas em metades mesial e distal (Figura 2D).

Figura 2 – Preparo das áreas de trabalho nas amostras. A: Divisão em terços da área de trabalho; B: Raspagem e alisamento radicular do dente, em sentido ápico-coronal; C: Secção transversal do dente com disco diamantado; D: Separação dos fragmentos mesial e distal das raízes

Os 63 fragmentos radiculares assim obtidos foram esterilizados em autoclave. Sob condições estéreis, os fragmentos foram aleatoriamente separados em grupos de nove e receberam um dos seguintes tratamentos na superfície radicular raspada:

- Grupo AC10-90: ácido cítrico a 10%, pH 1 por 90 segundos;
- Grupo AC10-120: ácido cítrico a 10%, pH 1 por 120 segundos;
- Grupo AC10-180: ácido cítrico a 10%, pH 1 por 180 segundos;
- Grupo AC50-90: ácido cítrico a 50% pH 1 em 90 segundos;
- Grupo AC50-120: ácido cítrico a 50% pH 1 por 120 segundos;
- Grupo AC50-180: ácido cítrico a 50% pH 1 por 180 segundos;
- Grupo C: os fragmentos deste grupo (controle) receberam apenas lavagem com soro fisiológico estéril durante 90 segundos.

O ácido cítrico, especialmente preparado para este experimento (Bauru Fórmulas Farmácia de Manipulação de Fórmulas Ltda. ME, Bauru, SP, Brasil), foi aplicado por fricção sobre as raízes, com o auxílio de bolinhas de gaze estéreis trocadas a cada 30 segundos e, após esse procedimento, o ácido foi profusamente lavado com soro fisiológico estéril.

Após os tratamentos, os fragmentos radiculares foram embalados em frascos de vidro tampados com chumaço de gaze identificados de acordo com o grupo a que pertenciam e foram novamente esterilizados em autoclave.

4.3 Culturas de FLPH

Imediatamente após a extração, os dentes não irrompidos foram colocados em meio de cultura Dulbecco modificado de Eagle (DMEM- Sigma Chemical Co. St Louis MO) suplementado com soro fetal bovino a 20% (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil) acrescido de 2% de solução antibiótica antimicótica (Sigma Chemical Co., São Paulo, Brasil) (Penicilina 10.000 UI, sulfato de estreptomicina a 200mg/mL, Anfotericina B). Sob condições estéreis, apenas o tecido contendo células do ligamento periodontal que estavam inseridas no terço médio da raiz foi gentilmente raspado com uma cureta afiada estéril. O material coletado foi tripsinizado e posteriormente colocado em centrifuga a 1000 rpm. Uma vez finalizada a centrifugação, o “pellet” foi transferido para placas de cultura contendo o mesmo meio e incubado a 37° C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. O meio foi substituído no dia seguinte e subsequentemente a cada três dias. (Figura 3)

Figura 3 - Cultura primária das células do ligamento periodontal. A: Imagem no microscópio de fase da cultura primária, onde se observam o explante e as células do ligamento periodontal

Após obtida a cultura primária, os FLPH foram utilizados na 5ª passagem. Para o experimento, as células foram cultivadas em DMEM + 10% SFB + 1% de solução antibiótica e antimicótica até que atingissem a subconfluência. Depois foram tripsinizadas com solução de tripsina e foi feita a contagem das células na câmara de Neubauer. Para a contagem das células, o “pellet” foi ressuspensionado em 1 ml de DMEM. Foi realizada uma diluição de 10x em um eppendorf e uma gota foi adicionada à câmara de Neubauer.

Para o plaqueamento foram colocados três fragmentos radiculares de cada grupo em placas de 24 poços (um em cada poço). Esses fragmentos foram cobertos por meio DMEM e sobre cada uma das superfícies tratadas foram semeadas 10^4 células. Após 24, 48 e 72 horas de semeadura (1 placa para cada período experimental) as amostras foram fixadas. Os fragmentos com as células foram mergulhadas por 15 dias em solução fixadora de Karnovsky, composta por 10 ml de glutaraldeído a 25%, 10 ml de paraformaldeído a 20%, 25 ml de tampão cacodilato 0,2 M pH 7,2 e 1 ml de cloreto de cálcio a 0,1 M (CaCl_2).

4.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Após 15 dias em solução Karnovsky, as amostras foram lavadas três vezes com solução tampão cacodilato 0,05 M por 10 min. Transcorrido esse tempo, as amostras foram pós-fixadas por tetróxido de ósmio a 2%, lavadas 3 vezes com água destilada e em seguida foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). Subsequentemente, foram colocadas nos “stubs” e receberam metalização por ouro.

Para a análise microscópica dos fragmentos foi empregado o microscópio eletrônico de varredura Aspex Express FEI, Endoven, Holand, obtido através do processo FAPESP 2012/06738-9 de responsabilidade do Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte da Disciplina de Endodontia da FOB-USP. Foram obtidas imagens à mesma distância e mesma ampliação do objeto (400 vezes) tomadas de 5 campos diferentes dos fragmentos: um central e um em cada um dos 4 cantos dos fragmentos.

4.5 Análise Quantitativa

- Diâmetro dos túbulos dentinários

Embora de início não tenha sido proposta deste estudo analisar a exposição dos túbulos dentinários, verificou-se que a maioria das fotomicrografias dos espécimes de 24 horas de cultura de FLPB continham campos totalmente desprovidos de células e que, portanto, permitiam visualizar túbulos dentinários expostos e ampliados pela ação do ácido. Assim, essa análise foi incluída no estudo como informação complementar.

As fotomicrografias medindo 300 x 300 pixels de cada um dos 5 campos fotografados de cada fragmento foram transferidas para o programa analisador de imagens Image J, versão 1.44o (National Institute of Health, USA) por meio do qual o diâmetro dos túbulos compreendidos dentro de uma área de 4225 pixel² (correspondente a um dos campos de uma grade sobreposta pelo programa às imagens) (Figura 4) foi medido em micrometros. Somente os túbulos completamente expostos foram considerados e os valores obtidos foram tabulados para posterior comparação das medidas médias entre os grupos.

Figura 4 – Fotomicrografia com grade superposta pelo programa analisador de imagens. A: Um campo de 300x300 pixel, no qual foi superposta uma grade constituída de quadrados de 4225 pixel² de área; B: Quadro indicado pela seta ampliado para medir em micrometros o diâmetro dos túbulos dentinários completamente expostos

- Área da superfície radicular recoberta por FLPH

Da área total em pixels (90000 pixel²) de cada fotomicrografia, foi subtraída a área da superfície ocupada por FLPH, delimitada com ajuda de uma ferramenta do programa Image J (Figura 5). O resultado desta subtração foi transformado em porcentagem da área total que se apresentou coberta por FLPH. Desta forma, para cada fragmento foram obtidas 5 medidas de área, que foram tabuladas para posterior comparação das medidas médias entre os grupos.

Figura 5 – Fotomicrografia de um espécimen. A: Fotomicrografia com células FLPH sobre a superfície radicular; B: Fotomicrografia com células FLPH delimitadas com ajuda do programa Image J

4.6 Análise Morfológica

Um examinador experiente e cego ao experimento (M.L.R.R.) analisou as fotomicrografias e descreveu as características morfológicas dos fibroblastos quanto ao espalhamento, achatamento, presença e intensidade de filopodias, para possível inferência quanto ao comportamento celular frente às superfícies dos diferentes grupos.

4.7 Análise dos resultados

A análise estatística dos resultados foi feita empregando o programa GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). A área de superfície radicular recoberta por FLPH foi comparada intragrupos e intergrupos pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. A ampliação dos túbulos dentinários expostos foi comparada entre os grupos pela análise de variância a um critério (ANOVA) com pós-teste de Tukey. Em ambos os testes foi adotado o nível de significância de 95%.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Análise Quantitativa

Diâmetro dos túbulos dentinários

Não houve interferência da concentração do ácido no diâmetro dos túbulos dentinários em nenhum dos tempos de desmineralização. Entretanto, houve aumento significativo do diâmetro dos túbulos de 90s para 120s quando foi empregada a concentração de 10%. O diâmetro médio dos túbulos variou entre $4,55 \pm 0,69 \mu\text{m}$ (grupo AC10-90) e $5,56 \pm 1,22 \mu\text{m}$ (grupo AC50-180) (Tabela 1).

Tabela 1 – Ampliação dos túbulos dentinários (μm) após desmineralização com ácido cítrico a 10% e 50%.

T AC	90s	120s	180s
10%	$4,55 \pm 0,69 \mu\text{m}$ a	$5,33 \pm 0,95 \mu\text{m}$ b	$5,54 \pm 1,56 \mu\text{m}$ b
50%	$5,32 \pm 1,89 \mu\text{m}$ ab	$4,98 \pm 1,39 \mu\text{m}$ ab	$5,56 \pm 1,22 \mu\text{m}$ b

T= tempo de desmineralização

AC= concentração do ácido cítrico

Letras diferentes na mesma linha ou coluna = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Em muitos dos espécimes dos grupos tratados com ácido cítrico a 50%, estava presente uma camada de reprecipitação, provavelmente do sal (citrato de cálcio) empregado na preparação do ácido cítrico, obliterando túbulos dentinários dos espécimes que receberam desmineralização por mais de 90s, dificultando a avaliação do diâmetro (Figura 6).

Não houve exposição de túbulos nos espécimes do grupo controle.

Figura 6 – Camada de reprecipitação sobre a superfície radicular. A: Espécime do grupo AC50-120 (1M); B: Espécime do grupo AC50-180 (3C1) com obliteração dos túbulos dentinários. É possível observar em A presença de um prolongamento citoplasmático celular (seta)

Porcentagem de área de superfície radicular recoberta por FLPH

O tempo de duração da desmineralização por ácido cítrico interferiu na área de cobertura por FLPH nos fragmentos tratados com as duas concentrações de ácido cítrico às 24 horas de cultura, mas não às 48 e 72 horas. Desta forma, quanto maior o tempo de desmineralização, menor foi a área de cobertura por FLPH cultivados por 24 horas. Essa diminuição foi mais evidente quando foi empregada a concentração de 50% (Tabela 2).

Os espécimes tratados com ácido cítrico a 10% apresentaram maior área de cobertura por fibroblastos às 24 horas de cultura do que os tratados com o ácido cítrico a 50% em todos os tempos de desmineralização. Nos tempos de cultura de 48 e 72 horas, os espécimes de todos os grupos tiveram comportamento semelhante, mantendo cobertura quase completa das superfícies por células.

Ao contrário do ácido a 10%, a concentração de 50% não produziu cobertura completa às 24 horas em nenhum espécime. Por esta razão o aumento da área de cobertura superficial de 24 para 48 horas foi significativo no grupo de 50%.

Tabela 2 – Porcentagem de área de superfície radicular recoberta por FLPH nos diferentes tempos de cultura, concentrações do ácido cítrico e tempos de aplicação do ácido.

T	Grupos de estudo						
	AC10-90	AC10-120	AC10-180	AC50-90	AC50-120	AC50-180	C
24h	98,82±2,57% ^a	89,97±15,01% ^{ab}	84,04±15,16% ^{acdA}	64,94±20,60% ^{bcdA}	77,04±34,05% ^{ad}	56,59±35,42% ^{bdA}	0,06±0,24% ^e
48h	99,51±1,08% ^a	90,86±25,07% ^a	81,41±29,43% ^{aA}	86,60±15,89% ^{aAB}	90,06±25,51% ^a	96,37±14,05% ^{aB}	0,72±1,12% ^b
72h	99,37±1,21% ^a	94,54±7,37% ^a	98,86±3,03% ^{aB}	100±0 ^{aB}	100±0 ^a	100±0 ^{aB}	1,03±2,75% ^b

Letras minúsculas diferentes na mesma linha ou maiúsculas diferentes na mesma coluna = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

T= tempo de cultura

5.2 Análise Qualitativa

Em geral, nos espécimes tratados com ácido cítrico a 10%, os FLPH estavam mais espalhados, achatados e com mais comunicações citoplasmáticas do que nos tratados com ácido cítrico a 50%. Nos espécimes dos grupos de 10% as células formavam uma monocamada já às 24 horas em cultura, aumentando o número de camadas em 48 e 72 horas (Figura 7). Por outro lado, a maioria dos espécimes dos grupos de ácido cítrico a 50% apresentavam monocamadas ainda depois de 48 horas em cultura, além de vários espécimes completamente desprovidos de células e apresentando deposição de uma crosta de material cristalizado na superfície (Figura 8).

No grupo AC10-90 às 24 horas de cultura, a monocamada de FLPH evidenciava cobertura quase total das superfícies com poucas áreas de exposição radicular. As células estavam espalhadas e achatadas sobre a superfície com pouca individualização entre elas, já que estavam em grande parte unidas umas às outras, impossibilitando visualizar seus limites. Nos espécimes dos grupos AC10-120 e AC10-180 às 24 horas as células mantiveram essas mesmas características morfológicas.

Figura 7 – Fotomicrografias eletrônicas de varredura dos espécimes tratados com ácido cítrico a 10%. A, B e C correspondem respectivamente aos grupos AC10-90, AC10-120 E AC10-180 às 24 horas de cultura. De D a F, os mesmos grupos às 48 horas de cultura e de G a I, os mesmos grupos às 72 horas em cultura. Observa-se que às 24 horas há uma monocamada celular recobrindo grande parte da superfície (de A a C). As 48 e 72 horas, os FLPH arranjam-se em multicamadas com cobertura praticamente total das superfícies (de D a I). As setas identificam alguns contornos celulares.

Nos espécimes tratados com ácido cítrico a 50% foi frequente a observação de uma camada cristalizada depositada sobre as superfícies radiculares, obliterando túbulos dentinários. Os FLPH cultivados sobre os espécimes do grupo AC50-90 por 24 horas foram raramente vistos e estavam esparsos sobre a superfície. Morfologicamente, apresentavam-se pequenos, arredondados ou em forma de fuso curto, com prolongamentos citoplasmáticos pouco extensos ou inexistentes. Essa morfologia se repetiu nos tempos de desmineralização de 90 e 120 segundos às 24 horas (Figuras 8 A e B). No tempo de 180 segundos, a desmineralização levou à formação de áreas de extensa exposição e alargamento dos túbulos dentinários intercaladas com áreas de precipitação de material cristalizado. Nas áreas de exposição tubular foram vistas poucas células achatadas e com filopodias penetrando dentro dos túbulos (Figura 8C).

Depois de 48 horas em cultura, formou-se uma monocamada de FLPH tanto nos espécimes desmineralizados por 90s quanto nos desmineralizados por 120 segundos, ainda que sobre a camada de cristalização precipitada (Figura 8 D e E). Nos espécimes tratados por 180 segundos, ainda era possível observar túbulos expostos parcialmente recobertos por células às 48 horas, em permeio a áreas de precipitação.

Apenas às 72 horas de cultura e somente nos espécimes tratados durante 90 segundos os FLPH formavam camadas superpostas de células achatadas e comunicantes entre si, recobrendo totalmente a superfície radicular (Figura 8G). Nos espécimes tratados por 120 e 180 segundos, ainda havia áreas de cobertura parcial da raiz por monocamadas celulares, achatadas e com amplas extensões citoplasmáticas (Figura 8 H e I).

No grupo controle, as células mostraram morfologia semelhante às 24, 48 e 72 horas. Um pequeno número de células estava presente com espalhamento muito reduzido, aparência arredondada e escassa filopodia sobre a superfície (Figura 9).

Figura 8 – Fotomicrografias eletrônicas de varredura dos espécimes tratados com ácido cítrico a 50%. A, B e C correspondem respectivamente aos grupos AC50-90, AC50-120 E AC50-180 às 24 horas de cultura. De D a F, os mesmos grupos às 48 horas de cultura e de G a I, os mesmos grupos às 72 horas em cultura. Observa-se que às 24 horas há poucas células distribuídas sobre uma superfície aparentemente recoberta por uma camada de precipitação (A e B). As células apresentam morfologia fusiforme ou arredondada com poucos prolongamentos citoplasmáticos ou filopodia, sem comunicação umas com as outras. Às 48 horas, uma monocamada celular mais homogênea com células mais achatadas e conectadas umas às outras é vista no espécime de 90 segundos de aplicação do ácido (D), mesmo em áreas de precipitação, como no espécime de 120 segundos visto em E, ou de grande ampliação de túbulos dentinários como o de 180 segundos visto em F. Em G observa-se um espécime de 72 horas do grupo AC50-90 onde uma monocamadas de FLPH cobre quase toda a superfície. Em H é vista uma área de grande ampliação e desobstrução dos túbulos dentinários sobre a qual uma monocamada irregular de FLPH é formada por células fusiformes, alongadas, tendendo ao achatamento e à comunicação intercelular. Em I, por sobre uma superfície de precipitação que pode ser vista por transparência, as células se superpõem formando mais de uma camada. As setas identificam alguns contornos celulares.

Figura 9 – Fotomicrografias eletrônicas de varredura dos espécimes do grupo controle. A figura A corresponde a um espécime de 24 h de cultura; B, um espécime de 48 h e C, um espécime de 72 h. Observam-se poucas células recobrando as superfícies (setas). Às 72 horas, os FLPH parecem estar “mais espalhados” com cobertura escassa sobre a superfície (C).

6 *Discussão*

6 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo indicaram que o tempo de desmineralização e a concentração da solução de ácido cítrico empregado na biomodificação de superfícies radiculares expostas à doença periodontal influencia o espalhamento e morfologia de FLPH, mas não a ampliação dos túbulos dentinários. Apontaram ainda para a superioridade da concentração de 10% em relação à de 50% do ácido cítrico quanto a alguns aspectos que passarão a ser discutidos.

Foi verificado que os tempos mais longos de duração da desmineralização em qualquer das concentrações, resultaram em menor área de cobertura superficial por FLPH no período mais precoce de cultura (24 horas) e essa diferença foi mais evidente para a concentração de 50%. Embora não tenha sido incluído um grupo controle negativo (sem doença periodontal) neste estudo, existe comprovação de que fibroblastos originários de ligamento periodontal humano inserem-se e recobrem completamente superfícies dentinárias saudáveis após 24 horas de cultura, estendendo seus prolongamentos citoplasmáticos para o interior dos túbulos dentinários, caracterizando sua estabilização à superfície (Al-NAZHAN et al., 2004). Foi muito próximo a esse o comportamento observado pelos espécimes do grupo tratado por ácido cítrico a 10% por 90 segundos também às 24 horas de cultura. Por essa razão, esse protocolo de aplicação do ácido cítrico foi considerado melhor do que as demais opções estudadas. Na concentração de 50%, o grupo que apresentou os melhores resultados, também foi o de 90 segundos de tempo de aplicação, mas comportamento celular semelhante ao do grupo AC1090 só foi visto após 48 horas de cultura. Esses resultados parecem significar que, em concentrações mais altas da solução ácida usada na desmineralização, podem ocorrer alterações nas superfícies radiculares que não são compatíveis com a inserção e diferenciação celular (FONTANARI et al., 2011, LAN et al., 1999, ROMPEN et al., 1999). Se tempos mais curtos de aplicação do ácido mais concentrado resultariam em superfície mais biocompatível, permanece como um ponto a ser investigado. No grupo controle, por outro lado, poucas células estavam presentes com morfologia de indiferenciação e de pouca afinidade com a superfície, uma vez que as células apresentavam-se com as bordas arredondadas, sem espalhamento ou achatamento sobre a superfície, o que não foi comparável a nenhum dos grupos tratados por ácido. Este achado confirma a necessidade da biomodificação de raízes expostas ao ambiente da bolsa periodontal.

De extrema importância para compreender e justificar os achados deste estudo foram as observações feitas por Hennequin; Pajot; Avignant (1994) quando do emprego de concentrações variando de 5% a 50% do ácido cítrico sobre raízes com diferentes níveis de mineralização. Embora a concentração do ácido não tenha influenciado a mobilização de minerais da matriz dentinária, a concentração de 50% resultou na precipitação de citrato de cálcio e de sais de fosfato nas superfícies desmineralizadas. Segundo os autores, a maior exposição de fosfoproteínas altamente fosforiladas (PP-H) na matriz orgânica produzida pelo ácido mais concentrado teria induzido a formação de hidroxiapatita, de certa forma anulando o efeito da desmineralização. De fato, a maioria dos espécimes dos grupos tratados com ácido cítrico a 50% neste estudo, evidenciou uma camada de reprecipitação, mesmo aqueles desmineralizados por apenas 90 segundos. Camada de deposição semelhante foi relatada por Amaral et al. (2011) sobre superfícies de dentina condicionadas com ácido fosfórico a 37% durante 3 minutos, que foi atribuída a uma provável precipitação de sais de fosfato de cálcio decorrente da saturação gradativa do ácido durante o tempo de desmineralização. É provável que o crescimento celular verificado sobre essas superfícies nos tempos de cultura mais tardios, neste estudo, signifique que a proliferação celular em meio mantido com nutrição constante, como é o caso da cultura, possa ocorrer de qualquer forma, já que a superfície radicular permanece protegida de contaminação e do crescimento de outros tipos celulares. Assim, foi observado que, às 48 e 72 horas de cultura, não houve diferença estatisticamente significativa na área de cobertura radicular quando comparadas as concentrações e tempos de desmineralização. Não é, todavia, o que se observa na condição clínica, onde a presença do sulco gengival expõe permanentemente a superfície radicular tratada à contaminação por bactérias do ambiente e à invasão por células epiteliais, cuja taxa de migração e proliferação é mais alta do que a dos fibroblastos (MAGNUSSON et al., 1985).

É importante ressaltar, por outro lado, que mesmo que a área de cobertura não tenha diferido estatisticamente entre as concentrações e tempos de aplicação do ácido cítrico nas culturas celulares mais tardias, foi observado que na concentração de 50%, as células se distribuíam em monocamadas até em alguns espécimes da cultura de 72 horas desmineralizados por 90 segundos, ao contrário do que ocorreu com a concentração de 10%, que resultou em superposição de camadas de fibroblastos a partir do tempo de cultura de 48 horas em todos os tempos de desmineralização. Não foram encontrados dados na literatura quanto ao número de camadas de fibroblastos cultivados para comparação com os dados aqui apresentados, mas pode-se sugerir que as superfícies condicionadas com o ácido a 10%

representaram um substrato mais favorável ao crescimento e espalhamento celular do que as condicionadas com ácido a 50%.

Ainda com relação à biocompatibilidade das superfícies condicionadas, foi possível verificar que desde o período inicial de cultura, os FLPH cultivados sobre superfícies condicionadas com ácido a 10% mostravam morfologia compatível com estágios mais avançados de diferenciação (CHANDRA; JAGETIA; BHAT, 2006, ROMPEN et al. 1999), já que estavam mais espalhados, achatados e com mais prolongamentos citoplasmáticos do que sobre os fragmentos tratados com ácido cítrico a 50%, que se apresentavam arredondado, ou formando fusos curtos e com poucos prolongamentos citoplasmáticos, de forma também vista por outros pesquisadores em fibroblastos cultivados sobre superfícies radiculares contaminadas (BIAGINI et al., 1992).

Tem sido relatado que fibroblastos inserem-se mais em superfícies condicionadas devido à exposição de fibrilas colágenas resultantes da desmineralização e à produção de uma superfície mais biocompatível (FARDAL; LOWENBERG, 1990, BOYKO et al., 1980), além da exposição de proteínas e fatores de crescimento do cimento (ZAMAN et al., 2000), assim como de constituintes da matriz extracelular na superfície que agiriam sobre os mecanismos de inserção dos fibroblastos (BABAY, 2011).

O comportamento favorável de fibroblastos provavelmente se deve também à preservação das características bioquímicas do colágeno e do sulfato de condroitina após o condicionamento pelo ácido a 10%, como foi demonstrado ocorrer em um estudo imunohistoquímico, onde a concentração de 10% foi usada durante dois minutos sobre raízes contaminadas pela doença periodontal (RUGGERI et al., 2007). Em contrapartida, foi verificada destruição da estrutura do colágeno exposto por ácido cítrico em concentrações muito baixas (entre 0,5% e 2%) por 3 minutos (CAVASSIM et al., 2011). Como o pH do ácido empregado por esses autores era próximo de 1, é de se supor que o longo tempo, de desmineralização tenha sido o responsável pelo resultado negativo encontrado. Já com aplicação de ácido cítrico na concentração de 10% por um minuto foi encontrada erosão da superfície radicular por outros autores (REIS et al., 2008) que ressaltaram a falta de padrão no preparo das soluções empregadas por diferentes pesquisadores.

Um interessante aspecto a ser considerado é a modificação da topografia de superfície produzida pela ação do ácido. Foi demonstrado que a rugosidade decorrente da desmineralização com ácido cítrico (pH 1) por 3 minutos favoreceu o espalhamento de fibroblastos gengivais humanos e recobrimento total da superfície radicular por essas células (BABAY, 2001). Talvez a caracterização topográfica da superfície desmineralizada possa vir a complementar os resultados de estudos futuros com diferentes protocolos de desmineralização.

O grau de mineralização da estrutura dental comprovou-se como fator de interferência no protocolo de desmineralização. Foi relatado que a concentração de 1% não foi eficiente em raízes hipermineralizadas e a de 25% em raízes de dentes não irrompidos resultou em dissolução excessiva da estrutura dental (FONTANARI et al., 2011). Não foi possível, neste estudo, estimar a duração da doença periodontal prévia à exodontia, para que alguma suposição pudesse ser feita quanto ao grau de mineralização das raízes que forneceram os fragmentos para análise. Em todo caso, como alguns autores verificaram que é por ação do pH e não da concentração que se dá a remoção da *smear layer*, tem sido recomendado que sejam evitadas as concentrações mais altas em função das desvantagens já apresentadas (HAZNEDAROĞLU, 2003, STERRET et al., 1993, HENNEQUIN; PAJOT; AVIGNANT., 1994, FONTANARI et al., 2011).

Não houve diferença estatística entre o diâmetro dos túbulos dentinários expostos pela ação do ácido, o que pode significar que este não é um fator preponderante na adesão e espalhamento de FLPH, assim como o é a produção de uma superfície biocompatível. Os resultados demonstraram que mesmo nos espécimes que apresentaram maior ampliação dos túbulos (grupo AC50180) foram vistas poucas células achatadas e com filopodias penetrando dentro dos túbulos dentinários.

O diâmetro médio dos túbulos neste estudo variou entre $4,55 \pm 0,69 \mu\text{m}$ e $5,56 \pm 1,22 \mu\text{m}$. Esses valores foram maiores do que os $3 \mu\text{m}$ encontrados após desmineralização com ácido cítrico a 3% durante 3 minutos por Abed et al. (2013) e do que os $3,18 \mu\text{m}$ encontrados por Labahn et al. (1992) após usar o ácido saturado por 4 minutos, ambos os estudos realizados com saudáveis, e do que os $1,33 \mu\text{m}$ encontrados por Shetty et al. (2008) após utilizar ácido cítrico saturado em pH 1 durante 5 minutos em raízes periodontalmente doentes. Como existe grande variação de conteúdo mineral dependendo do tipo de dente, da área da raiz usada no estudo e do tempo de exposição à doença periodontal, fica praticamente

impossível fazer qualquer especulação a respeito de uma justificativa para essas discrepâncias entre os estudos.

Analizando o contexto geral do emprego dos ácidos na biomodificação radicular, este ainda permanece como um ponto de controvérsia entre pesquisadores e clínicos, uma vez que não tem sido encontrada correspondência entre resultados favoráveis obtidos *in vitro* com os dados frustrantes advindos de estudos clínicos que não conseguem relatar qualquer diferença na profundidade de sondagem e nível de inserção clínica em dentes que receberam e que não receberam o tratamento por biomodificação ácida (MARIOTTI, 2003, SUCHETTA et al., 2011). Essas diferenças tem sido atribuídas à falta de calibração dos pesquisadores, ao tamanho reduzido da amostra, variações quanto ao tempo de aplicação, pH e concentração do ácido, ausência de grupo controle e tempo de realização dos estudos clínicos (MARIOTTI, 2003).

Mais do que buscar um protocolo confiável para um procedimento envolvido no tratamento periodontal, provavelmente, uma das maneiras de se avaliar a racionalidade e o valor clínico da biomodificação radicular empregando ácido cítrico seria a realização de estudos clínicos bem controlados, baseados em princípios biológicos e com suficiente poder estatístico para que os eventos laboratoriais possam ser reproduzidos nos pacientes, nos quais a recuperação da saúde, perdida pela instalação da doença periodontal não deve deixar de ser sempre o objetivo principal das pesquisas em periodontia.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

O ácido cítrico na concentração de 10% promoveu superfícies radiculares mais receptivas ao crescimento de fibroblastos do ligamento periodontal humano que se apresentaram espalhadas, achatadas e com abundantes prolongamentos citoplasmáticos, recobrando maior área de superfície radicular do que a concentração de 50%.

O protocolo de aplicação que demonstrou melhores resultados foi o de ácido cítrico a 10% durante 90 segundos.

A ampliação dos túbulos dentinários pareceu não ser influenciada pela concentração do ácido e não influenciou a área de cobertura superficial por fibroblastos, assim como sua morfologia.

Referências

REFERÊNCIAS

ADRIAENS, P. A.; ADRIAENS, L. M. Effects of nonsurgical periodontal therapy on hard and soft tissues. **Periodontol** 2000, Denmark, v. 36, n. 1, p. 121-145, Out. 2004.

ADRIAENS, P. A. et al. Ultrastructural observations on bacterial invasion in cementum and radicular dentin of periodontally diseased human teeth. **J Periodontol**, Bélgica, v. 59, n. 8, p. 493-503, Ago. 1988.

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 J**, Isfahan, v. 10, n. 2, p. 232-237, Mar. 2013.

ALEO, J. J. et al. The presence and biologic activity of cementum-bound endotoxin. **J Periodontol**, Filadelfia, v. 45, n. 9, p. 672-675, Set. 1974.

ALEO, J. J. et al. In vitro attachment of human gingival fibroblasts to root surfaces. **J Periodontol**, Filadelfia, v. 46, n. 11, p. 639-645, Nov. 1975.

AL-NAZHAN, S. SEM observations of the attachment of human periodontal ligament fibroblasts to non-demineralized dentin surface in vitro. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, Arábia Saudita, v. 97, n. 3, p. 393-397, Mar. 2004.

AMARAL, N. G. et al. Comparison among four commonly used demineralizing agents for root conditioning: a scanning electron microscopy. **J Appl Oral Sci**, Bauru, v. 19, n. 5, p. 469-475, Out. 2011.

AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Treatment of plaque-induced gingivitis, chronic periodontitis and other clinical conditions. **J Periodontol**, v. 72, n. 12, p. 1790-1800, Dez. 2001.

AMIREDDY, R. et al. Efficacy of a root conditioning agent on fibrin network formation in periodontal regeneration: A SEM evaluation. **J Indian Soc Periodontol**, Madhyapradesh, v. 15, n. 3, p. 228-234, Jul. 2011.

ARMITAGE, G. C.; CHRISTIE, T. M. Structural changes in exposed cementum. I. Light microscopic observations. **J Periodont Res**, San Francisco, v. 8, n.6, p. 343-355, 1973.

BABAY, N. Attachment of human gingival fibroblasts to periodontally involved root surface following scaling and/or etching procedures: a scanning electron microscopy study. **Braz Dent J**, Reino da Arábia Saudita, v. 12, n. 1, p. 17-21, 2001.

BAKER P. J. et al. An in vitro screening model to evaluate root conditioning protocols for periodontal regenerative procedures. **J Periodontol**, Lewiston, v. 71, n. 7, p. 1139-1143, Jul. 2000.

BAKER, D. L. et al. Fibrin clot adhesion to dentin conditioned with protein constructs: an in vitro proof-of-principle study. **J Clin Periodontol**, Portland, v. 32, n. 6, p. 561- 566, Jun. 2005.

BARROS, J. P. C. **Efeitos do condicionamento ácido na descontaminação da superfície radicular e no recobrimento radicular: análise MEV e estudo clínico randomizado**. 2013. 152 p. Tese (Mestrado em Ciências Odontológicas Aplicadas, área de concentração Reabilitação Oral, linha de pesquisa Periodontia) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2013.

BELAL, M. H. et al. A time-dependent effect of PDGF-BB on adhesion and growth of cultured fibroblasts to root surfaces. **Oral Diseases**, El-Minya, v. 12, n. 6, p. 543-552, Nov. 2006.

BELAL, M. H. et al. Effect of Er:YAG laser combined with rhPDGF-BB on attachment of cultured fibroblasts to periodontally involved root surfaces. **J Periodontol**, El-Minya, v. 78, n. 7, p. 1329-1341, Jul. 2007.

BIAGINI, G. et al. In vitro growth of periodontal fibroblasts on treated cementum. **Quintessence Int**, Italia, v. 23, n. 5, p. 335-340, Maio. 1992.

BILGIN, E. et al. Morphological changes in diseased cementum layers: a scanning electron microscopy study. **Calcif Tissue Int**, Ankara, v. 74, n. 5, p. 476-485, Maio. 2004.

BIMSTEIN, E. et al. Root surface characteristics of primary teeth from children with prepubertal periodontitis. **J Periodontol**, Jerusalem, v. 69, n. 3, p. 337-347, Mar.1998.

BLOMLÖF, J. P. S.; BLOMLÖF, L. B; LINDSKOG, S. F. Smear layer formed by different root planning modalities and its removal by an ethylenediaminetetracetic acid gel preparation. **Int J Periodont Restorat Dent**, Huddinge, v. 17, n.3, p. 243-249, Jun. 1997.

BOYKO, G. A.; BRUNETTE, D. M.; MELCHER, A. H. Cell attachment to demineralized root surfaces in vitro. **J Periodontal Res**, Toronto, v. 15, no. 3, p. 297-303, Maio. 1980.

CAVASSIM, R. et al. Influence of concentration, time and method of application of citric acid and sodium citrate in root conditioning. **J Appl Oral Sci**, Araraquara, v. 20, n. 3, p. 376-383, Maio/Jun 2012.

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**, India, v. 18, n. 1, p. 32-37, Jan/Fev 2014.

CHANDRA, R. V.; JAGETIA, G. C.; BHAT, K. M. The attachment of V79 and human periodontal ligament fibroblasts on periodontally involved root surfaces following treatment with EDTA, citric acid, or tetracycline HCL: an SEM in vitro study. **J Contemp Dent Pract**, Manipal, v. 15, n. 1, p. 44-59, Fev. 2006.

FARDAL, O.; LOWENBERG, B. F. A quantitative analysis of the migration, attachment, and orientation of human gingival fibroblasts to human dental root surfaces in vitro. **J Periodontol**, Toronto, v. 61, n. 8, p. 529-535, Ago.1990.

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

GAMAL, A. Y.; BAYOMY, M. M. Effect of cigarette smoking on human PDL fibroblasts attachment to periodontally involved root surfaces in vitro. **J Clin Periodontol**, Cairo, v. 29, n. 8, p. 763–770, Ago. 2002.

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**, Cairo, v. 27, n.5, p. 347–353, Maio. 2000.

GRZESIK, W. J.; NARAYANAN, A. S. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. **Crit Rev Oral Biol Med**, Chapel Hill, v. 13, n. 6, p. 474-484, Nov. 2002.

GUPTA, R. et al. Evaluation of thickness of cementum of periodontally diseased teeth of non-diabetic and type 2 diabetic patients: A scanning electron microscopy study. **J Indian Soc Periodontol**, India, v. 17, n. 5, p. 592-596, Set. 2013.

HATFIELD, C. G.; BAUMHAMMERS, A. Cytotoxic effects of periodontally involved surfaces of human teeth. **Archs Oral Biol**, Pensilvania, v. 16, n. 4, p. 465-468, Abr. 1971.

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

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

HIGASHI, T. Collagen formation at the tooth-cell interface: comparative ultrastructural study on the effect of partial demineralization of cementum with dentin. **J Periodontol**, Japon, v. 66, n. 4, p. 267-273, Abr. 1995.

KHOSRAVI, M, et al. Comparative effectiveness of hand and ultrasonic instrumentations in root surface planing in vitro. **J Clin Periodontol**, Tehran, v. 31, n. 3, p. 160–165, Mar. 2004.

KINA, J. R. et al. Presence of bacteria in dentinal tubules. **J Appl Oral Sci**, Araçatuba, v. 16, n. 3, p. 205-208, Maio/Jun 2008.

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

LAN, W. C. et al. The effects of extracellular citric acid acidosis on the viability, cellular adhesion capacity and protein synthesis of cultured human gingival fibroblasts. **Aust Dent J**, Taipei, v. 44, n. 2, p. 123-130, Jun. 1999.

MAGNUSSON, I. et al. Connective tissue attachment formation following exclusion of gingival connective tissue and epithelium during healing. **J Periodontal Res**, v.20, no. 2, p. 201-208, Mar. 1985.

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

MINOCHA, T.; RAHUL, A. Comparison of fibrin clot adhesion to dentine conditioned with citric acid, tetracycline, and ethylene diamine tetra acetic acid: An in vitro scanning electron microscopic study. **J Indian Soc Periodontol**, India, v. 16, n. 3, p. 333-341, Jul. 2012.

NANCI, A.; BOSSHARDT, D. D. Structure of periodontal tissues in health and disease. **Periodontol 2000**, Reino Unido, v. 40, n. 1, p. 11–28, Fev. 2006.

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

POLSON, A. M.; PROYE, M. P. Fibrin linkage: a precursor for new attachment. **J Periodontol**, v. 54, n. 3, p. 141-147, mar.1983.

PRASAD, S. S. Effects of citric acid and EDTA on periodontally involved root surfaces: a SEM study. **J Contemp Dent Pract**, Krishna, v. 13, n. 4, p. 446-451, Jul. 2012.

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**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 12, p. 1608-1615, Dez. 2008.

SELVING, K. A.; HALS, E. Periodontally diseased cementum studied by correlated microradiography, electro probe analysis and electron microscopy. **J. Periodontol Res**, Bergen, v. 12, n. 6, p. 419-429, Nov. 1977.

STEINFORT, J.; DEBLAUWE, B. M.; BEERTSEN, W. The inorganic components of cementum-and enamel-related dentin in the rat incisor. **J Dent Res**, Holanda, v. 69, n. 6, p. 1287-1292, Jun. 1990.

SUCHETHA, A. et al. Root Biomodification- A Boon or Bane? **Indian J Stomatol**, v. 2, n. 4, p. 251-255, 2011.

ROMPEN, E. H. et al. Human periodontal ligament fibroblast behavior on chemically conditioned dentine: an in vitro study. **J Periodontol**, Liège, v. 70, n. 10, p. 1144-1452, Out. 1999.

RUBO, M. L. **Avaliação do desgaste superficial provocado pela raspagem manual e ultra-sônica em raízes humanas periodontalmente envolvidas e do potencial inflamatório destas sobre o tecido conjuntivo subcutâneo de ratos (Rattus norvegicus – VAR. albinus)**. 1989. 164 p. Tese (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 1989.

RUGGERI, A. JR. et al. Effects of citric acid and EDTA conditioning on exposed root dentin: An immunohistochemical analysis of collagen and proteoglycans. **Arch Oral Biol**, Bologna, v. 52, n. 1, p. 1-8, Jan. 2007.

STERRETT, J. D.; BANKEY, T.; MURPHY, H. J. Dentin demineralization. The effects of citric acid concentration and application time. **J Clin Periodontol**, Nova Scotia, v. 20, n. 5, p. 366-370, Maio. 1993.

SHETTY, B. et al. 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**, Bangalore, v. 12, n. 1, p. 8-15, Jan. 2008.

VERMA, S. J.; GOHIL, M. H. Scanning electron microscopy study to analyze the morphological characteristics of root surfaces after application of Carisolv gel in association

with scaling and root planing: In vitro study. **J Indian Soc Periodontol**, India, v. 16, n. 3, p. 329-332, Jul. 2012.

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**, Sapporo, v. 71, n. 7, p. 1094-1099, Jul. 2000.

Apêndices

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Departamento de Prótese – Disciplina de Periodontia

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O(A) senhor(a) está sendo convidado a fazer a doação do seu dente que será extraído. A extração do seu dente faz parte do tratamento do senhor. Caso queira nos doar seu dente ele será utilizado na pesquisa intitulada “Efeito do protocolo de desmineralização por ácido cítrico sobre a adesão e proliferação de fibroblastos de ligamento periodontal humano cultivados sobre raízes dentárias expostas à doença periodonta”. Essa pesquisa é desenvolvida pela cirurgiã-dentista Carmen Emilia Caba Paulino, orientada pela Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Rubo de Rezende, da disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, FOB-USP. O objetivo desta pesquisa é verificar se a limpeza com uma substância em diferentes concentrações e tempos de aplicação sobre as raízes de dentes humanos extraídos são benéfica para as células da boca. A doação de seu dente é voluntária. Você não receberá nenhum dinheiro por essa doação. Também essa doação não lhe trará nenhum risco a sua saúde, tampouco não lhe trará algum benefício. O benefício trazido pela pesquisa será para futuros pacientes, caso um dos tratamentos de limpeza estudados seja mais eficaz que os atuais. O senhor não terá nenhum gasto com a doação de seu dente e diante da natureza da pesquisa, não existe possibilidade de danos ao senhor pela simples doação de seu dente, entretanto, em eventuais danos decorrentes da pesquisa, você será indenizado. Sua recusa em doar seu dente não lhe trará nenhum prejuízo ao seu tratamento que será realizado em qualquer clínica da FOB/USP.

Para qualquer dúvida ou esclarecimento sobre a pesquisa, o senhor(a) poderá entrar em contato com a pesquisadora no endereço Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla 9-75, Vila Universitária, Bauru, São Paulo, Tel.: (14) 99650-6073, e-mail: emiliacaba@usp.br. Para reclamações ou denúncias sobre a pesquisa poderá contatar o Comitê de Ética em Pesquisa FOB/USP, à Alameda Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75, Vila Universitária, ou pelo telefone (14)3235-8356, e-mail: cep@fob.usp.br.

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a) _____, portador da cédula de identidade _____, após leitura minuciosa das informações constantes neste TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, devidamente explicada pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente de que sua participação na pesquisa acima descrita se reduz na doação de seu dente, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO concordando em doar seu dente para a pesquisa proposta.

Fica claro ao doador do dente que, uma vez feito a doação para a pesquisa proposta, não poderá mais requerer de volta o dente doado, principalmente se a pesquisa já tiver começado e o dente já estiver sendo utilizado. Todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica). Por fim, como pesquisadora responsável pela pesquisa, comprometo-me a cumprir todas as exigências contidas no item IV.3 da resolução do CNS/MS n. 466 de dezembro de 2012, publicada em 13 de junho de 2013.

Por estarmos de acordo com o presente termo o firmamos em duas vias (uma via para o doador do dente e outra para a pesquisadora) que serão rubricadas em todas as suas páginas e assinadas ao seu término.

Bauru, SP, _____ de _____ de

Assinatura do Doador do dente

Carmen Emilia Caba Paulino
Pesquisadora

APÊNDICE B – Termo de doação para dentes extraídos por razões periodontais **Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru****Departamento de Prótese – Disciplina de Periodontia****PARA DENTES EXTRAÍDOS POR RAZÕES PERIODONTAIS**

Declaro ter sido esclarecido sobre quais são os motivos que levaram a necessidade de remoção do(s) dente(s)_____ (código), estes condenados e extraídos por razões periodontais e concordo em doá- lo(s) para que o(s) mesmo(s) seja(m) utilizado(s) na pesquisa de título “Efeito do protocolo de desmineralização por ácido cítrico sobre a adesão e proliferação de fibroblastos de ligamento periodontal humano cultivados sobre raízes dentárias expostas à doença periodontal”, que objetiva testar produtos para a desinfecção de dentes durante cirurgias periodontais. Desenvolvida por Carmen Emilia Caba Paulino e a Profa. Dra. Maria Lúcia Rubo de Rezende.

Fui ainda esclarecido pelas pesquisadoras que minha identidade não será divulgada por qualquer meio e que o material recolhido será utilizado unicamente para a presente pesquisa.

Bauru, _____ de _____ de _____

Assinatura

APÊNDICE C – Termo de doação para dentes extraídos não irrompidos ou impactados

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Departamento de Estomatologia – Disciplina de Cirurgia

PARA DENTES EXTRAÍDOS NÃO IRROMPIDOS OU IMPACTADOS

Declaro ter sido esclarecido sobre quais são os motivos que levaram a necessidade de remoção do(s) dente(s) _____ (código), que, embora estejam bons ou seja não estão irrompidos ou impactados, precisam ser extraídos por indicação de meu dentista; concordo em doá-lo(s) para que o(s) mesmo(s) seja(m) utilizado(s) na pesquisa de título “Efeito do protocolo de desmineralização por ácido cítrico sobre a adesão e proliferação de fibroblastos de ligamento periodontal humano cultivados sobre raízes dentárias expostas à doença periodontal”, que objetiva testar produtos para a desinfecção de dentes durante cirurgias periodontais. Desenvolvida por Carmen Emilia Caba Paulino e a Profa. Dra. Maria Lúcia Rubo de Rezende.

Fui ainda esclarecido pelas pesquisadoras que minha identidade não será divulgada por qualquer meio e que o material recolhido será utilizado unicamente para a presente pesquisa.

Bauru, _____ de _____ de _____

Assinatura

Anexos

ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de ética em pesquisa

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Efeito do protocolo de desmineralização por ácido cítrico sobre a adesão e proliferação de fibroblastos de ligamento periodontal humano cultivados sobre raízes dentárias expostas à doença periodontal

Pesquisador: Carmen Emilia Caba Paulino

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 23098313.1.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 484.759

Data da Relatoria: 27/11/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de mestrado intitulado “Efeito do protocolo de desmineralização por ácido cítrico sobre a adesão e proliferação de fibroblastos de ligamento periodontal humano cultivados sobre raízes dentárias expostas à doença periodontal”, de autoria de Carmen Emília Caba Paulino sob a orientação da prof^a Dr^a Maria Lúcia Rubo de Rezende. A pesquisadora irá trabalhar apenas com dentes e pretende recrutar os doadores de dentes nas clínicas da FOB/USP. Ela pretende trabalhar com 32 dentes recém- extraídos por doença periodontal avançada e 3 dentes sem doença periodontal extraídos por indicação cirúrgica. A pesquisadora procurará comprovar a seguinte hipótese: Há diferença na adesão e proliferação de células derivadas do ligamento periodontal humano em cultura quando se aplica o ácido cítrico a 10% e 50% em tempos diferentes sobre raízes periodontalmente comprometidas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Pretende-se avaliar comparativamente o efeito da aplicação do ácido cítrico em concentrações de 10% e 50% em pH 1 durante 90, 120 e 180 segundos, na taxa de proliferação e adesão de fibroblastos derivados do ligamento periodontal humano cultivados sobre fragmentos de raízes dentárias periodontalmente comprometidas.

Objetivo Secundário: Contribuir para o embasamento da plausibilidade biológica desse procedimento bem como para o estabelecimento de um possível protocolo de tratamento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não haverá riscos aos participantes da pesquisa, uma vez que os dentes serão extraídos como parte do tratamento odontológico a que necessitam serem submetidos.

Benefícios: Os benefícios não serão diretos. Uma vez estabelecido um protocolo para biomodificação radicular, futuros pacientes com doença periodontal poderão se beneficiar das conclusões do trabalho.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa que não apresenta nenhum problema ético para sua realização, sem procedimentos ou práticas invasivas diretamente com seres humanos. As pesquisadoras irão trabalhar apenas com dentes recém-extraídos. Os sujeitos da pesquisa participarão apenas com a doação de seu(s) dente(s), os quais terão indicação de extração. É uma pesquisa bastante interessante porque pode trazer benefícios futuros a pacientes com doenças periodontais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados todos os documentos necessários para a realização da pesquisa.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A presente pesquisa foi analisada por este comitê em data de 30 de Outubro de 2013 e naquela data se considerou o projeto com pendências para sua realização. Tendo retornado para nova análise e suprida todas as pendências sou de parecer pela aprovação da pesquisa.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Esse projeto foi considerado APROVADO na reunião ordinária do CEP de 27.11.2013. Ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final. Quando da apresentação deste, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação assinados e rubricados.

BAURU, 09 de Dezembro de 2013

Assinador por:
Izabel Regina Fischer Rubira Bullen
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9			
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA		CEP: 17.012-901	
UF: SP		Município: BAURU	
Telefone: (14)3235-8356	Fax: (14)3235-8356	E-mail: cep@fob.usp.br	

ANEXO B – Parecer consubstanciado do Comitê de ética em pesquisa

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: 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

Pesquisador: Carmen Emilia Caba Paulino

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 23098313.1.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 607.850

Data da Relatoria: 26/03/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de mestrado intitulado inicialmente de “Efeito do protocolo de desmineralização por ácido cítrico sobre a adesão e proliferação de fibroblastos de ligamento periodontal humano cultivados sobre raízes dentárias expostas à doença periodontal”, depois mudou de nome para “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”, de autoria de Carmen Emília Caba Paulino sob a orientação da profª Drª Maria Lúcia Rubo de Rezende. A pesquisadora irá trabalhar apenas com dentes e pretende recrutar os doadores de dentes nas clínicas da FOB/USP. Ela pretende trabalhar com 32 dentes recém-extraídos por doença periodontal avançada e 3 dentes sem doença periodontal extraídos por indicação cirúrgica. A pesquisadora procurará comprovar a seguinte hipótese: Há diferença na adesão e proliferação de células derivadas do ligamento periodontal humano em cultura quando se aplica o ácido cítrico a 10% e 50% em tempos diferentes sobre raízes periodontalmente comprometidas.

Objetivo da Pesquisa:

Hipótese: Há diferença na adesão e proliferação de células derivadas do ligamento periodontal humano em cultura quando se aplica o ácido cítrico a 10% e 50% em tempos diferentes sobre raízes periodontalmente comprometidas.

Objetivo Primário: Pretende-se avaliar comparativamente o efeito da aplicação do ácido cítrico em concentrações de 10% e 50% em pH 1 durante 90, 120 e 180 segundos, na taxa de proliferação e adesão de fibroblastos derivados do ligamento periodontal humano cultivados sobre fragmentos de raízes dentárias periodontalmente comprometidas.

Objetivo

Secundário:

Contribuir para o embasamento da plausibilidade biológica desse procedimento bem como para o estabelecimento de um possível protocolo de tratamento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não haverá riscos aos participantes da pesquisa, uma vez que os dentes serão extraídos como parte do tratamento odontológico a que necessitam serem submetidos. Os riscos da extração dos dentes estão ligados ao tratamento e não a pesquisa em si.

Benefícios:

Os benefícios não serão diretos. Uma vez estabelecido um protocolo para biomodificação radicular, futuros pacientes com doença periodontal poderão se beneficiar das conclusões do trabalho.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa que não apresenta nenhum problema ético para sua realização, sem procedimentos ou práticas invasivas diretamente com seres humanos. As pesquisadoras irão trabalhar apenas com dentes recém-extraídos. Os sujeitos da pesquisa participarão apenas com a doação de seu(s) dente(s), os quais terão indicação de extração. É uma pesquisa bastante interessante porque pode trazer benefícios futuros a pacientes com doenças periodontais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados todos os documentos necessários para a realização da pesquisa.

Recomendações:

Que nos esclareça a dúvida abaixo solicitada.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A presente pesquisa foi analisada por este comitê em data de 30 de Outubro de 2013 e naquela data se considerou o projeto com pendências para sua realização. Tendo retornado para nova análise; este projeto foi analisado em reunião no dia 25 de novembro de 2013 e naquela data a pesquisa foi aprovada. Novamente a pesquisadora, através de sua orientadora Profa. Dra. Maria Lúcia Rubo de Rezende, encaminha um ofício a este CEP datado de 10 de Março de 2014 solicitando o seguinte: „Solicito a alteração do título do projeto de pesquisa „Efeito da aplicação de agentes desmineralizantes na taxa de proliferação e adesão de fibroblastos derivados do ligamento periodontal humano sobre fragmentos de raízes dentárias periodontalmente comprometidas„ de autoria de Carmen Emília Caba Paulino, sob minha orientação.

Tal solicitação deve-se ao fato de que, no decorrer do estudo, foi verificada a impossibilidade da contagem de células prevista no projeto original, já que os fibroblastos não são facilmente individualizados na imagem de microscopia eletrônica de varredura, o que torna impreciso o estudo da taxa de adesão e proliferação celular. Assim, julgamos conveniente suprimir essa análise e avaliar apenas a porcentagem de área recoberta por células nessa superfície. Desta forma, o título do projeto deve ser mudado para „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“.

Essa alteração de título já foi feita no projeto anexado na plataforma Brasil, por isso sou de parecer pela aprovação da mudança do título do projeto, apenas gostaria de solicitar à pesquisadora que nos informasse se a constatação acima informada que culminou com a mudança do título também não alteraria a hipótese, objetivo primário e secundário inicialmente propostos pela da pesquisa. Apenas nos esclareça essa dúvida.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Esse projeto foi considerado APROVADO na reunião ordinária do CEP de 26.3.2014, com base nas normas éticas da Resolução CNS 466/12. Ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final. Quando da apresentação deste, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação assinados e rubricados.

BAURU, 08 de Abril de 2014

Assinador por:

Izabel Regina Fischer Rubira Bullen
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLA 75 QUADRA 9

Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:**17.012-901

UF: SP **Município:** Bauru

Telefone: (14)3235-8356

Fax: (14)3235-8356

E-mail: cep@fob.usp.br