UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

RENATO TADDEI DE TOLEDO BARROS

Efeitos dos tratamentos mecânico, químico e fotodinâmico na proliferação de células da granulação óssea humana sobre raízes dentárias.

BAURU

2016

RENATO TADDEI DE TOLEDO BARROS

Efeitos dos tratamentos mecânico, químico e fotodinâmico na proliferação de células da granulação óssea humana sobre raízes dentárias.

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

Orientadora: Profª Drª Carla Andreotti Damante

BAURU

2016

Barros, Renato

B278e Efeitos dos tratamentos mecânico, químico e fotodinâmico na proliferação de células da granulação óssea humana sobre raízes dentárias/ Renato Taddei de Toledo Barros. Bauru – 2016
76p. : il. ; 31cm

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

Orientadora: Profª Drª Carla Andreotti Damante

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: 579.436
Data: 26/03/2014

Folha de aprovação

Dedicatória

Dedico esta dissertação aos meus pais e minha família pelo apoio que me deram durante os anos de mestrado.

Agradecimentos

Agradeço a Profª Drª Carla A. Damante pela orientação e apoio durante todo o meu período de mestrado.

Agradeço ao Prof. Dr Sebastião, Profª Drª Adriana, Profª Drª Malu e Profª Drª Mariana pela orientação e apoio.

Agradeço aos alunos de pós-graduação Rafael Ferreira e Paula Karam por toda ajuda que me deram nas fases laboratoriais da pesquisa.

Agradeço aos funcionários Ivânia, Edilaine, Marcão e Marcela pelo suporte em todas as fases da pós-graduação.

Agradeço a toda a pessoa que direta ou indiretamente esteve envolvido com esse trabalho.

Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.

Charles Chaplin

Efeitos dos tratamentos mecânico, químico e fotodinâmico na proliferação de células da granulação óssea humana sobre raízes dentárias.

A técnica do enxerto de granulação óssea tem demonstrado bons resultados na recuperação do periodonto e na melhora dos parâmetros clínicos dos dentes com comprometimento periodontal. Pouco se sabe porém, a respeito de qual tipo de tratamento de superfície radicular se faz mais condizente com o emprego dessa técnica. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar a proliferação de células de granulação óssea sobre fragmentos radiculares com os seguintes tratamentos de superfície: Controle - somente raspagem, EDTA, terapia fotodinâmica (PDT- laser InGaAIP - 30mW, 30s, 45J/cm², 660nm + azul de toluidina), e ácido cítrico com tetraciclina. Todos os grupos teste receberam previamente tratamento com raspagem e alisamento com 20 golpes de cureta. Células de granulação óssea foram cultivadas em quadruplicata sobre os fragmentos por um período de 24, 48 e 72 horas. Após esse período de cultivo os fragmentos foram fixados para análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Cinco campos por fragmento foram usados para a visualização e contagem de células aderidas a superfície radicular (centro, campo superior direito e esquerdo e campo inferior direito e esquerdo). A análise da calibração do examinador foi feita através de uma combinação de testes estatísticos como erro casual de Dahlberg, erro sistemático e correlação de Pearson ($p<0,05$). A análise da amostra foi realizada através do ANOVA de medidas repetidas complementado por Tukey, com nível de significância de 5% ($p<0,05$). Os resultados demostraram diferenças estatisticamente significantes, quanto ao numero de células, para as superfícies tratadas com terapia fotodinâmica no período de 72 h ($p<0,05$). Através de nossos resultados concluímos que o tratamento radicular com terapia fotodinâmica favorece a proliferação de células de granulação óssea humanas *in vitro*.

Palavras Chave: Lasers. Fotoquimioterapia. Técnicas de Cultura de Células. Osteoblastos.

The effects of mechanical, chemical and photodynamic treatment on the proliferation of osseous granulation cells on dental roots.

The osseous granulation graft has been demonstrating good results on the periodontal healing, resulting the improvement of clinical periodontal parameters. There are very few knowledge about what kind of dental surface would be more proper for the application of this technique. The aim of this study was to evaluate the proliferation of osseous granulation cells on human root fragments treated by different techniques as scaling and root planning (control), citric acid plus tetracycline, EDTA and photodynamic therapy (PDT – InGaAIP, 45J/cm², 30mW, 30s, 660nm, toluidine blue O). All test groups were previously treated which 20 curette strikes. Osseous granulation cells was culture in quadruplicate on these fragments for 24h, 48h and 72h. After that, all fragments were fixed and prepared for analysis in Scanning Electron Microscopy (SEM). Aiming to counting the cells adhered on the roots, we obtained electron micrographs of 5 areas (center, upper right and left field, lower right and left field). The examiner calibration was analyzed by Dahlberg Casual Error measurement, systematic error test and Pearson correlation test ($p<0.05$). Statistical analysis was performed by ANOVA, followed by Tukey test, with a 5% level of significance ($p<0.05$). There were significant differences in cell number after 72h culture in favor of PDT group ($p<0,05$). We can conclude that the surface treatment of roots which PDT favor the proliferation of osseous granulation cells *in vitro*.

Keywords: Lasers. Photochemotherapy. Cell Culture Techniques. Osteoblasts.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

β-TCP	Beta fosfato tricálcio (β-tricalcium phosphate)
AC	Ácido Cítrico
ANOVA	Teste de análise de variância
aPDT	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
ATP	Adenosina trifosfato
cm^2	Centímetros quadrados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Er:YAG	Érbio ítrio alumínio granada
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
FS	Fotossensitizador
GO	Granulação óssea
HCl	Ácido clorídrico
IL-1β	Interleocina 1 beta
InGaAIP	Índio gálio alumínio fósforo
J/cm^2	Joule por centímetro quadrado
H	Hora
LPS	Lipopolissacarídeos
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg/ml	Miligramas por mililitro
MB	Azul de metileno
MMPs	Metaloproteinases da matriz
MMP-8	Metaloproteinase da matriz 8
MMP-9	Metaloproteinase de matriz 9
mW	Milliwatt
mW/cm^2	Miliwatt por centímetro quadrado
N	Normalidade
Nd:YAG	Neodímio ítrio alumínio granada
nm	Nanômetro
PBS	Tampão fosfato-salino (phosphate buffered saline)
PDT	Terapia fotodinâmica
PGE_2	Prostaglandina E2
RAR	Raspagem e alisamento radicular
TB	Azul de toluidina
TGF-β1	Fator de transformação do crescimento beta 1

USP	Universidade de São Paulo
W	Watts
µs	Microsegundo
µm	Micrômetro
µg/ml	Micrograma por mililitro
%	Porcentagem
ºC	Grau celsos

SUMÁRIO

1-Introdução..... 11

2-Revisão de Literatura..... 17

2.1-Evidências do papel prejudicial da contaminação radicular..... 19

2.2-Tratamentos químicos da raiz..... 20

2.3-Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT)..... 27

2.4-A nova proposta da aPDT como agente de condicionamento radicular..... 32

2.5-Células de granulação óssea (GO)..... 33

3-Proposição..... 35

4-Material e Método..... 39

4.1-Preparo dos fragmentos radiculares..... 41

4.2-Grupos experimentais..... 42

4.3-Cultura de células..... 43

4.4-Análise estatística..... 44

5-Resultados..... 45

6-Discussão..... 49

7-Conclusão..... 57

Referências..... 61

Anexos..... 71

1-Introdução

1-Introdução

A raspagem e o alisamento radicular muitas vezes não são capazes de tratar com total eficiência a doença periodontal, bem como podem deixar restos de cálculo, placa e partículas de dentina contaminada no interior do sulco ou bolsa periodontal a ser tratada. Por isso, novos métodos complementares de tratamentos têm sido utilizados, visando tanto uma melhor desinfecção do local bem como a criação de um ambiente mais propicio para a inserção dos tecidos periodontais (GEORGE et al. 2013).

O ácido cítrico e a tetraciclina tópica são os agentes que classicamente tem sido usados como complementares da raspagem e alisamento radicular. O ácido cítrico, por possuir PH ácido, tem a capacidade de remover e degradar restos de smear layer, alterar a superfície radicular, expondo suas fibras colágenas e gerar um ambiente mais favorável para a nova inserção periodontal (SAMPAIO et al., 2009). A tetraciclina, além de sua atividade antimicrobiana, tem a capacidade se impregnar sobre a estrutura dentinária e de ser liberada em sua forma ativa sobre os tecidos adjacentes a raiz (BAKER et al., 1983). Possue ainda a capacidade de inibir a ação de enzimas proteolíticas como as MMPs (TÜTER et al., 2010; EMINGIL et al., 2004).

O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) tem sido usado como agente de condicionamento radicular. Esse agente possui propriedade quelante, isso é, capacidade de se ligar a íons metálicos, entre eles, o cálcio. Por essa razão é usado em odontologia principalmente nas especialidades de endodontia e periodontia. Uma de suas finalidades é remover os restos de smear layer deixados pela instrumentação radicular no caso da periodontia. Atua também de forma semelhante aos agentes desmineralizantes, removendo o cálcio da superfície radicular e, dessa forma, alterando a superfície radicular, expondo as fibras colágenas da superfície e criando um ambiente mais adequado ao processo de nova inserção (SAMPAIO et al., 2009).

Uma outra forma de tratamento denominada terapia fotodinâmica foi inicialmente desenvolvida com a finalidade de desinfecção dos patógenos ligados à gengivite e periodontite. Consiste no uso de um fotossensitizador (normalmente um corante) associado a um fotossensibilizador (luz ou radiação eletromagnética proveniente de um laser) (FOOTE, 1991).

Quando aplicado no sulco ou bolsa periodontal o fotossensitizador tem a capacidade de se ligar as bactérias causadoras da doença periodontal. O contato com luz proveniente do laser faz com que se desencadeiem reações irreversíveis sobre os patógenos previamente corados (FOOTE, 1991). Esse tratamento auxilia a raspagem e alisamento radicular uma vez que pode acessar locais muitas vezes inacessíveis às curetas.

Células de granulação óssea consistem em células retiradas de um alvéolo em processo de reparação após a extração. Normalmente essas células são usadas para correção de defeitos ósseos em periodontia (PASSANEZI et al., 1989). Essas células são passiveis de serem cultivadas em laboratório (BARBOSA, 2012). Em nosso estudo, nos as cultivamos sobre fragmentos radiculares. Dessa forma, pôde-se criar um meio de estudo *in vitro* sobre comportamento dessas células em contato com raízes tratadas por diferentes métodos de condicionamento radicular.

Desenvolvemos um estudo para responder questões sobre qual seria o comportamento dessas células sobre raízes de dentes extraídos por doença periodontal. As raízes foram cortadas em pequenos fragmentos e condicionadas com raspagem, raspagem e ácido cítrico, raspagem e EDTA e raspagem seguido de terapia fotodinâmica. Células de granulação óssea foram cultivadas sobre essas superfícies por períodos de 24, 48 e 72 horas. Os resultados demostraram diferenças estatisticamente significantes, quanto ao número de células, para as superfícies tratadas com terapia fotodinâmica no período de 72 h.

Escassos são os números de trabalhos que tratam sobre o cultivo e proliferação de osteoblastos sobre raízes dentais. Em nossas pesquisas em base de dados somente dois trabalhos foram encontrados. Schwartz et al. (2000) constatou que osteoblastos cultivados sobre superfícies de dentina tratadas com tetraciclina hidroclorada aumentaram sua proliferação. Além disso, induziram a uma maior diferenciação celular dos osteoblastos aumentando sua produção de fosfataze alcalina e TGF-β1 e PGE_2. Outro artigo indicou um aumento na adesão e crescimento celular de osteoblastos cultivados sobre superfícies de cemento previamente desmineralizadas com ácido cítrico (ZHANG; LIU, 1998).

Além dessa lacuna na literatura, até o presente momento não foram encontrados estudos sobre o cultivo de osteoblastos sobre superfícies dentárias tratadas com terapia fotodinâmica. Portanto, o presente trabalho trará importantes informações sobre qual é o melhor tratamento de superfície radicular para a

proliferação de osteoblastos humanos. Tal informação é necessária, uma vez que na regeneração óssea pela técnica da granulação óssea, ou até em técnicas regenerativas mais recentes com biomateriais carregados de células, os osteoblastos são colocados diretamente em contato com as raízes.

2-REVISÃO DE LITERATURA

2-REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Evidências do papel prejudicial da contaminação radicular

O principal fator etiológico da doença periodontal é o biofilme bacteriano. Os tratamentos periodontais visam à sua remoção, porém, quando utilizados apenas procedimentos convencionais como raspagem e alisamento radicular, as endotoxinas bacterianas podem permanecer aderidas ao cemento radicular favorecendo a destruição progressiva do periodonto e prejudicando a regeneração periodontal. A invasão bacteriana pode ocorrer até os 300µm mais externos ao cemento (ADRIAENS et al., 1988).

Hatfield e Baumhammers (1971) testaram a hipótese de que o biofilme da doença periodontal impregnado na superfície radicular poderia ser tóxico para a atividade celular. Para isso, cultivaram células epiteliais em contato com fragmentos de dentes contaminados por doença periodontal e inclusos sem contaminação. Foram testadas alterações morfológicas e de ciclo de mitose nessa células. Para o grupo de dentes inclusos e grupo controle (sem fragmento dental) as células cultivadas apresentaram núcleo e membrana celular distinta, média de 2 nucléolos por células, citoplasma de aparência espumosa e projeções citoplasmática em formato estrelado. O índice mitótico foi de 2 a 3 em uma aproximação de 450 vezes e não houve indícios de vacualização celular. No grupo que continha raízes periodontalmente comprometidas foram notadas alterações celulares irreversíveis. Foi verificado a presença de vacualização, aglutinação de cromatina, e turgor celular e ausência de mitose em 24 horas de cultivo em contato com as raízes. Com 48 horas de cultivo notou-se a presença de picnose, coagulação citoplasmática e aumento da vacualização. Com 96 horas de cultivo notou-se a total perda das características celulares. Os autores atribuíram as alterações morfológicas ocorridas nas células aos fatores de toxina contidos nas secreções das bolsas periodontais que impregnaram a superfície radicular.

Fortes evidências mostram que a tratamento da superfície radicular pode trazer benefícios para vários tipos de tratamento periodontal (ALBAIR; COBB; KILLOY, 1981; FRANK; FIORE-DONNO; CIMASONI, 1983; AOKI et al., 2004). Nos casos de tratamento por terapia regenerativa, a biocompatibilidade da raiz se faz fundamental para que sobre ela possam se formar as estruturas periodontais pretendidas. Há varias formas de se melhorar a biocompatibilidade radicular. A mais comum delas é através de raspagem manual com ou sem o uso de instrumentos sônicos ou ultrassônicos (EBERHARD et al., 2003). Sabe-se porém que a remoção total do cálculo, placa ou do cemento e dentina infectada é difícil de alcançar (EBERHARD et al., 2003, GARCIA et al., 2013). O tratamento mecânico da raiz também pode deixar restos de *smear layer* infectada e levar à formação de fissuras na raiz tratada (AOKI et al., 2004). Para que se possa contornar esse problema outros tipos de condicionamento da superfície radicular são aconselháveis (AOKI et al., 2004). Dessa forma, passaram a ser utilizadas substâncias químicas modificadoras da superfície radicular como ácido cítrico, tetraciclina ácida e EDTA a fim de tornar a superfície mais biocompatível. Normalmente esse condicionamento de superfície cumpre um papel coadjuvante e complementador da raspagem (AOKI et al., 2004).

2.2 - Tratamentos químicos da raiz

Garret, Crigger e Egelberg (1978) estudaram o efeito do ácido cítrico sobre raízes de dentes com comprometimento periodontal. Ao todo 16 dentes foram selecionados e extraídos para o estudo. Um grupo foi tratado com raspagem e alisamento radicular após a extração enquanto que no outro grupo não houve a raspagem. Todos os dentes foram divididos ao meio no eixo longitudinal e uma das metades recebeu tratamento de superfície com acido cítrico (PH1 por 3 minutos). As amostras foram então avaliadas sob microscopia eletrônica. Poucas alterações de superfície foram detectadas no grupo que não foi tratado com raspagem independentemente da aplicação do ácido. Nesse grupo foi detectado inclusive a presença de bactérias na superfície das amostras. As amostras do grupo tradado

com a raspagem e condicionado com ácido cítrico mostraram uma maior presença de exposição das fibras colágenas e de depressões na superfície em relação ao grupo que não recebeu a raspagem, inclusive com diferenças estatisticamente significantes. Os autores atribuíram a ineficiência do acido cítrico sobre superfícies previamente não raspadas a hipermineralização do cemento nas raízes como consequência da doença periodontal. Com este trabalho ficou evidente a importância do condicionamento ácido somente como coadjuvante da raspagem e que pouco ou nenhum efeito pode ser conseguido sem a raspagem prévia. Os autores ainda afirmam que o condicionamento ácido, sozinho, poderia ter efeitos somente em raízes ainda não hipermineralizadas e não expostas ao cálculo.

Foi demonstrado histologicamente que, dentes tratados com condicionamento com ácido cítrico apresentaram nova inserção de fibras tanto sobre cemento neoformado quanto sobre aquele que não foi retirado na raspagem (ALBAIR; COBB; KILLOY, 1981). Poison e Michel (1983) realizaram um estudo sobre a utilização coadjuvante do ácido cítrico em macacos. Nesse estudo 24 dentes foram extraídos e a parte coronal de suas raízes foi raspada. Desses 24 dentes, 12 foram tratados com ácido cítrico (PH1). Antes de serem reimplantados em seus alvéolos todos os 24 dentes foram lavados com solução salina. Os macacos foram sacrificados no período de 1, 3, 7 e 21 dias após o procedimento. Resultados histológicos no primeiro dias após a reimplantação mostraram um tecido conjuntivo aderido, através de ligações de fibrina, à superfície radicular na área de instrumentação no grupo em que fora feito o tratamento de superfície com ácido cítrico. No grupo em que houve o tratamento somente com raspagem não havia adesão dos tecidos a superfície radicular. Ao longo dos dias subsequentes as células epiteliais foram migrando apicalmente no grupo em que não houve o tratamento com ácido, chegando a um nível inferior à crista alveolar a partir do sétimo dia. No grupo em que foi feito o tratamento com ácido cítrico não houve migração epitelial apical em todo o período de estudo. Os autores atribuíram a diferença dos resultados a natureza da superfície radicular dos grupos e a exposição das fibras colágenas nos grupos tratado com ácido cítrico.

Common e Macfall (1983) estudaram o efeito do ácido cítrico no tratamento da superfície radicular durante o emprego da técnica do deslize lateral. Foram selecionados cinco pacientes cujos incisivos inferiores estavam indicados para extração. Em cada paciente foram selecionados dois dos desses dentes, onde foram

criados defeitos cirúrgicos na vestibular, os quais foram tratados pela técnica do deslize lateral. Em um dos dois dentes, que foi considerado como grupo controle, não houve qualquer tipo de condicionamento químico da raiz sendo somente realizado a raspagem e o alisamento radicular antes do procedimento de deslize lateral. No grupo teste foi realizado, além da raspagem e alisamento radicular, o condicionamento radicular com ácido cítrico (PH 1). Os dentes foram extraídos em bloco contendo os tecidos adjacentes. As extrações foram realizadas nos períodos de 1, 2 semanas e de 1, 3 e 5 meses após as cirurgias. Grandes diferenças histológicas foram notadas na comparação entre os dois grupos. No grupo controle houve uma maior migração apical do epitélio juncional, maior mobilidade do retalho e ainda um menor recobrimento radicular. Quanto ao grupo teste notou-se uma melhor adesão do tecido conjuntivo, presença de adesão de fibras na superfície dental e cementogênesis. Os autores afirmam, a partir dos dados desse estudo, que a desmineralização da raiz pode aumentar e acelerar o processo de adesão do tecido conjuntivo à raiz.

Clinicamente há melhora no nível de inserção após o tratamento com ácido cítrico e essa inserção pode envolver a presença de cemento ou a ligação direta pelas fibras colágenas desmineralizadas da dentina com o colágeno secretado pelos fibroblastos. A desmineralização da dentina é uma importante fase natural para a obtenção de nova inserção conjuntiva e o ataque ácido pode acelerar esse processo natural e assim melhorar o sucesso terapêutico (FRANK; FIORE-DONNO; CIMASONI, 1983).

Wikesjö et al. (1988) realizou um estudo em beagles para comparar o efeito de alguns agentes de condicionamento radicular no tratamento de lesões de furca cirurgicamente criadas. Esses defeitos foram cirurgicamente criados nos segundos, terceiros e quartos pré-molares e deixados expostos ao ambiente bucal por 6 semanas. Após esse período foi realizado cirurgia de recobrimento dos defeitos utilizando os seguintes agentes de condicionamento radicular: ácido cítrico (solução saturada, 3 minutos de condicionamento), ácido cítrico com fibronectina, tetraciclina (100mg/ml, 5 minutos de condicionamento) e tetraciclina com fibronectina. Após 12 semanas, foram realizados cortes histológicos nos dentes e alguns parâmetros foram analisados, entre eles: incidência de epitelização na região da furca, reparação por tecido conjuntivo na região da furca e formação óssea. Para esses três parâmetros avaliados o condicionamento radicular com ácido cítrico (sem

fibronectina) obteve os melhores resultado, apesar de diferenças estatisticamente significantes não haverem ocorrido quando o condicionamento com ácido cítrico (sem fibronectina) foi comparado ao condicionamento com tetraciclina (sem fibronectina). Os autores afirmam que tanto o condicionamento com ácido cítrico quanto o condicionamento com tetraciclina foram eficientes para a obtenção de inserção conjuntiva nos dentes submetidos ao experimento e que o uso concomitante da fibronectina não contribuiu para esse processo.

Com a finalidade de testar o efeito do condicionamento radicular com tetraciclina no ganho de inserção conjuntiva Alger, Solt e Vuddhakanok (1990) realizaram um estudo em humanos em 22 dentes de 5 pacientes. Os dentes estavam periodontalmente comprometidos e indicados para extração. Foi feita abertura em retalho total e realizado marcações na vestibular dos dentes. Após a abertura do retalho, três tipos diferentes de condicionamento radicular (que correspondiam aos dois grupos testes e ao grupo controle) foram realizados: somente raspagem, raspagem com tetraciclina, e raspagem com tetraciclina conjuntamente com fibronectina. O retalho foi então suturado coronalmente. A tetraciclina usada nesse experimento possuía PH 2 e concentração de 100 mg/ml. Nos dois grupos testes o tempo de aplicação da tetraciclina foi de 3 minutos. Cortes histológicos foram realizados com a finalidade de comparar o nível da inserção conjuniva após cada tipo de tratamento. Análises de significância estatística não foram realizadas em função do pequeno número de amostras. Os maiores níveis de inserção conjuntiva aconteceram no grupo tratado com raspagem e tetraciclina, seguido pelo grupo tratado com tetraciclina e fibronectina. O grupo controle obteve os piores resultados. Os autores sugeriram que, apesar da aplicação de tetraciclina impedir a migração epitelial, o uso subsequente da fibronectina poderia interferir negativamente nesse efeito, restaurando assim a capacidade de proliferação e migração das células epiteliais.

Foi demonstrado que a tetraciclina pode inibir a ação das colagenases e também pode ser um importante medicamento no tratamento coadjuvante das doenças inflamatórias gengivais. Certos experimentos demonstraram que a doxiciclina pode modular a resposta do organismo frente às doenças gengivais ou periodontais, melhorando parâmetros clínicos e que esse mecanismo de ação ocorre de uma forma independente da ação microbiana do medicamento (TÜTER et al., 2010; EMINGIL et al., 2004).

Mais recentemente uma mistura de ácido cítrico com tetraciclina tem sido usada. George et al., (2013) comparou uma série de métodos de condicionamento radicular em campo fechado, para tratamento de dentes periodontalmente comprometidos, com a finalidade de analisar suas repostas em parâmetros clínicos e também contagem de bactérias da placa coletada do sulco antes e após o tratamento. O grupo 1 consistiu no tratamento somente com raspagem, o grupo 2 somente o uso da tetraciclina (sem raspagem), o grupo 3 com raspagem e tetraciclina e o grupo 4 com raspagem e uma mistura de tetraciclina com ácido cítrico. Eles relataram diferenças estatisticamente significantes quando o grupo 1 foi comparado ao grupo 4 com relação ao ganho de nível clínico de inserção. Para um determinado tipo de bactéria houve redução estatisticamente significante entre o grupo 4 quando comparado a qualquer outro grupo. Os autores concluíram que protocolo usado no grupo 4 foi efetivo para melhorar as condições clinicas dos dentes tratados bem como para alterar a microbiota intra-sulcular do mesmo.

Boyko, Brunette e Melcher (1980) estudaram o efeito da adesão de fibroblastos derivados do ligamento periodontal de macacos sobre raízes de dentes de porcos. As raízes foram extraídas e o ligamento periodontal e os tecidos moles remanescentes foram removidos com o auxilio de lâmina de bisturi e de uma solução enzimática. As raízes foram imersas em soluções de 0.6 N HCl (por uma hora) e 0,5M de EDTA (por 48 horas) e também deixadas sem aplicação de condicionamento algum, como um grupo controle. As células de fibroblastos foram colocadas em meio de cultura junto às raízes previamente citadas por 2 horas para que a adesão celular a essas superfícies fossem testadas. Após esse tempo as raízes foram retiradas do meio de cultura. As células aderidas as suas superfícies foram removidas e contadas com o auxílio de um hemocitômetro. O artigo afirma que um número consideravelmente maior de células se aderiram aos grupos que receberam o tratamento de superfície ($20,9.10^4$ por cm^2 para EDTA e $20,7.\ 10^4$ por cm^2 para HCl) em relação ao grupo controle ($10,1.10^4$ por cm^2).

Pitaru e Melcher (1987) pesquisaram o efeito do uso do EDTA na adesão e proliferação de fibroblastos. Para isso usaram um modelo de estudo onde duas superfícies radiculares (com cemento aderido) foram colocadas lado a lado, em discos, separadas por uma distancia de 500µm. Segundo os autores essa distancia foi usada para simular a distancia interdental. Houve dois grupos no experimento. No grupo controle os discos contendo as superfícies radiculares foram deixadas em

contato com PBS por 30 minutos enquanto que no grupo teste os discos com as superfícies radiculares foram desmineralizadas com EDTA 12% por 30 minutos e então lavadas com PBS. Fibroblastos gengivais na concentração de $2.5x10^5$ foram cultivados sobre os discos por um período de 20 a 30 dias. As amostras foram então preparadas para análise em microscopia ótica e eletrônica. Os fibroblastos se apresentaram orientados perpendicularmente à superfície radicular e seus prolongamentos celulares foram detectados permeando os feixes de fibras expostas nas amostras que foram previamente submetidas à desmineralização caracterizando adesão dessas células a superfície radicular. Em contrapartida, as células se presentaram em disposição paralela à superfície radicular no grupo controle. A existência de lacunas (locais não preenchidos por células) no cemento que recobria as superfícies radiculares também foi um fato comumente observado no grupo controle. Os autores sugerem que a desmineralização do cemento sobre superfície radicular pode aumentar a adesão celular sobre a superfície radicular.

Blomlöf, Blomlöf e Lindskog (1996) estudaram *in vivo* o efeito da aplicação do EDTA e da tripsina na alteração das superfícies radiculares. Para isso, selecionaram 24 dentes periodontalmente comprometidos e indicados para extração e testaram a aplicação desses agentes em campo fechado (sem abertura de retalho). Os dentes foram divididos em quatro grupos. O grupo 1 (grupo controle) recebeu somente raspagem e foram imediatamente extraídos. O grupo 2 foi tratado com raspagem e extraídos como no grupo 1 porém, após a extração, os dentes extraídos receberam um banho de 20 minutos de tripsina (1%). O grupo 3 foi tratado com raspagem seguida da aplicação de EDTA gel (24% em carboximetilcelulose) e então extraídos. O grupo 4 foi tratado da mesma forma do grupo 3 porém, após a extração, os dentes receberam um banho de 20 minutos de tripsina como no grupo 2. O objetivo dos banhos de tripsina era de remover os restos celulares e os vestígios de sangue para uma melhor visualização da superfície radicular. As superfícies radiculares foram então fixadas para a visualização em microscópio eletrônico de varredura. As superfícies radiculares do grupo 2 apresentaram restos de smear layer e obstrução dos tubos dentinários enquanto que no grupo 4 as superfícies radiculares estavam livres de smear layer e os túbulos dentinários estavam desobstruídos e evidentes. No grupo 4 também se pôde constatar a presença de fibras colágenas em maior aumento. Os autores afirmam que o uso do EDTA como coadjuvante da raspagem e

alisamento radicular pode trazer benefícios ao tratamento periodontal e para o condicionamento radicular em campo fechado.

Mayfield et al. (1998) estudaram a aplicação clinica do EDTA em defeitos infra-ósseos. Nesse estudo participaram um total de 36 pacientes com lesões periodontais infra-ósseas que foram divididos em dois grupos. Após a fase de preparo inicial 18 desses pacientes foram tratados com técnica a retalho, que consistia na abertura e no debridamento do defeito ósseo, seguido pela aplicação de EDTA gel (24% em carboximetilcelulose). Os outros 18 participantes da pesquisa foram tratados com a mesma técnica a retalho, porém sem a aplicação de EDTA. Houve diferenças estatisticamente significantes quanto ao ganho de inserção quando os dois grupos foram comparados ao baseline. Quando se compara os dois grupos tratados houve ganho de inserção maior no grupo tratado com EDTA em relação ao grupo controle apesar da diferença não ser estatisticamente significante.

Gamal (2011) investigaram o efeito do condicionamento radicular com EDTA como coadjuvante no tratamento de lesões periodontais infra-ósseas tratadas com beta fosfato tricálcio (β-TCP). Entre os critérios de inclusão destacavam-se: pacientes com periodontite severa, com ao menos 2 dentes indicados para extração e com defeitos infra-ósseos em dentes anteriores. Foram selecionados 60 pacientes. Os pacientes passaram pela faze de preparo inicial em então foram divididos em 6 grupos para a realização do tratamento cirúrgico. Para todos os grupos a técnica de acesso e sutura foi a mesma: abertura em retalho total, debridamento do defeito, retirada do tecido de granulação e sutura coronal. Foram também realizados marcações com broca para demarcar o tamanho dos defeitos para posterior análise em microscópio. Os dois primeiros grupos (G1 e G2) não foram tratados com condicionamento radicular com EDTA e receberam somente o enxerto beta-tricálcio-fosfato (β-TCP) preenchendo os defeitos. Todos os outros grupos (G3, G4, G5 e G6) receberam, anteriormente a colocação do enxerto, condicionamento radicular prévio com EDTA gel (24%) por 2 a 4 minutos conforme o grupo. Um dos dentes de cada paciente foi extraído imediatamente após a cirurgia enquanto o outro foi extraído 14 dias depois. Foi realizada análise, em microscopia eletrônica, da área de superfície radicular em que o enxerto de beta-tricálcio-fosfato (β-TCP) estava aderido à superfície radicular. Não houve qualquer adesão do enxerto à superfície radicular nos grupos não tratados com EDTA (G1 e G2), independentemente do tempo de extração. Já para todos os outros grupos em que houve aplicação prévia de EDTA a

adesão do enxerto ocorreu chegando a ocupar 82,7% de adesão à superfície em um dos grupos. Os autores atribuíram os resultados a remoção da *smear layer* e a modulação bioquímica e mecânica da superfície radicular tratada com EDTA.

Silva et al. (2016) pesquisaram o efeito do condicionamento radicular sobre a adesão de fibroblastos humanos. Para isso, 192 blocos de dentina foram obtidos de 92 incisivos inferiores humanos indicados para extração por periodontite. Houve 6 grupos nesses estudo: o que não recebeu nenhum tipo de tratamento de superfície (Grupo controle), grupo que recebeu somente a raspagem, grupo tratado com raspagem e acido cítrico, grupo tratado com raspagem seguido da aplicação de EDTA (24% EDTA gel pH 7.0 por 1 min), grupo tradado com raspagem e aplicação de tetraciclina proveniente de capsulas e grupo tratado com raspagem seguido de aplicação de tetraciclina gel. Os grupos tratados com EDTA e tetraciclina em gel obtiveram os melhores resultados quanto à adesão de fibroblastos, inclusive com diferenças estatisticamente significantes em relação aos outros grupos teste e ao grupo controle.

2.3 – Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT)

A aPDT é fundamentada em uma reação fotoquímica que ocorre entre um laser de baixa intensidade e um corante. Para tal terapia, os lasers mais utilizados são os diodos de baixa intensidade.

Lasers de diodo (Figura 1) possuem em sua composição, uma combinação de Gálio (Ga), Arseneto (Ar), Aluminio (Al) e Índio (In). Seu comprimento de onda pode variar de 655nm a 980 nm, situando-se, portanto, na faixa do vermelho e infravermelho (AOKI, 2004). Na aPDT são usados os lasers vermelhos de 630 a 660 nm. Diferentemente do que ocorre com os lasers de alta intensidade cujas propriedades incluem o corte, a vaporização e a hemostasia dos tecidos, os lasers de baixa intensidade são usados para outras finalidades, que incluem a modulação das repostas biológicas dos tecidos (WALSH, 1997).

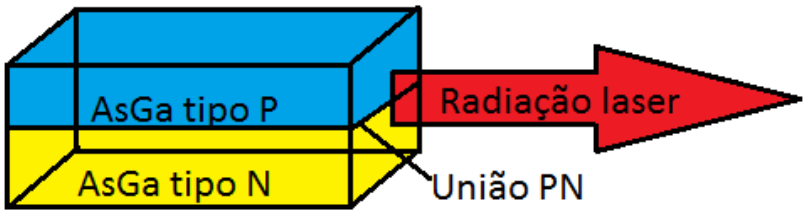

Figura 1: Laser de Diodo

A terapia fotodinâmica antimicrobiana tem sido utilizada em odontologia para eliminação de bactérias em canais radiculares, bolsas periodontais e para o tratamento da peri-implantite. Os primeiros experimentos em periodontia mostraram que a fotossensibilização letal de bactérias periodontopatógenas é um procedimento viável e possível. Também se sugeriu que a terapia pode ser útil no tratamento antimicrobiano da doença periodontal e teria como vantagens evitar a resistência bacteriana e a baixa toxicidade aos tecidos (WILSON, 1994).

Durante a terapia fotodinâmica, a luz excita um corante ou fotossensitizador (FS) transformando-o em seu estado triplete excitado. Sucedem-se daí dois tipos de reações. Na reação tipo 1 ocorre a tranferência de elétrons ou a subtração de um hidrogênio entre o fotossensitizador e a molécula orgânica. Isso gera radicais livres que reagem com o oxigênio local produzindo moléculas reativas como o peróxido de hidrogênio. Essas moléculas reativas são capazes de provocar lesões irreversíveis na célula alvo (FOOTE, 1991).

Na reação tipo 2 ocorre uma interação direta entre o FS em seu estado triplete excitado e o oxigênio local. Ocorre uma reação que leva a formação de oxigênio em uma estado extremamente reativo chamado oxigênio singleto. Essa molécula reativa pode interagir com as estruturas biológicas ao seu redor, lesionando-as através de reações oxidativas (FOOTE, 1991).

O oxigênio singleto perde sua capacidade de provocar dano em pouco tempo (cerca de 0,04 µs). Isso faz com que as reações danosas se estendam muito pouco além do local onde elas se iniciaram (interior das bactérias) diminuindo assim, de forma muito considerável, o dano às células e tecidos humanos (TAKASAKI et al., 2009).

Para que a terapia fotodinâmica seja eficaz algumas propriedades do FS são desejadas, entre elas: um largo espectro de ação, baixa toxicidade e grande afinidade à células de microrganismos (SOUKOS; GOODSON, 2011).

Chondros et al. (2009) pesquisaram ação da terapia fotodinâmica como coadjuvante no tratamento periodontal. Pacientes com periodontite crônica (n=24) foram divididos em dois grupos: Um grupo controle tratado somente com raspagem e profilaxia e um grupo teste tratado com raspagem e profilaxia seguido de terapia fotodinâmica. Foi usado, como FS uma solução cloridrato de fenotiazina (Helbo blue) com um laser de diodo com ondas de 670nm e 75 mW/cm^2. Foram realizadas aferições de índice de placa de toda boca, sangramento a sondagem de toda boca, profundidade de sondagem, recessão gengival, nível clínico de inserção e sangramento nos sítios com bolsa no baseline e após 3 e 6 meses de tratamento. Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, a favor da terapia fotodinâmica, foram detectadas no período de 6 meses para o sangramento e profundidade de sondagem de toda boca. Houve também diferenças estaticamente significantes, a favor da terapia fotodinâmica, em ambos os períodos (3 e 6 meses) para o sangramento nos sítios com bolsa.

Lulic et al. (2009) estudaram o efeito da terapia fotodinâmica coadjuvante com a raspagem na mudança de variáveis clínicas de bolsas periodontais de pacientes com periodontite crônica. Os parâmetros clínicos foram medidos no baseline e após 3, 6 e 12 meses. As bolsas de todos os pacientes foram raspadas no período do baseline, logo após as aferições e então os sítios com bolsa foram aleatoriamente divididos para formarem dois grupos. O grupo teste recebeu terapia fotodinâmica nos períodos do baseline e após 3, 6 e 12 meses. Foi usado um laser de diodo com 670 nm de comprimento de onda e 75mW/cm^2 e cloridrato de fenotiazina como fotossensitizador (HELBO blue). O tempo de aplicação do laser foi de um minuto em cada bolsa. Os procedimentos no grupo controle se procederam de forma semelhante com a única diferença de que o laser foi usado em um comprimento de onda que não podia sensibilizar o fotossensitizador. Resultados estatisticamente significantes em relação ao baseline no grupo teste foram encontrados em todos os períodos de avaliação (3, 6 e 12 meses) quanto à redução de sangramento a sondagem e também no período de 6 meses para as variáveis de nível de inserção e profundidade de sondagem. O mesmo não se deu com o grupo controle. Na comparação entre os grupos houve diferenças estatisticamente significantes em favor do grupo teste, no período de 6 meses, para as variáveis de sangramento a sondagem, profundidade de sondagem e nível de inserção. Os autores sugerem que o uso da terapia fotodinâmica pode melhorar os parâmetros clínicos no tratamento

de manutenção de bolsas periodontais e que os melhores resultados podem ser obtidos no período de 6 meses.

Ge et al. (2011) estudaram o efeito coadjuvante da terapia fotodinâmica no tratamento periodontal. Fizeram parte desse estudo 58 pessoas com periodontite crônica e, no mínimo, 4 sítios com sondagem entre 6 e 9 mm em 2 quadrantes da boca. Antes do início do tratamento (baseline) foram realizadas aferições de profundidade de sondagem, nível clínico de inserção e sangramento a sondagem. O estudo foi dividido em 3 grupos. O grupo controle (grupo A) foi tratado somente com raspagem. O grupo “B” e “C” foi tratado com raspagem com posterior aplicação imediata de terapia fotodinâmica nos sítios que apresentavam 5 mm ou mais de profundidade de sondagem no baseline. Para a terapia fotodinâmica foi usado 0.2 ml de 0.01% de azul de metileno. O laser usado foi um laser de diodo com 670 nm de comprimento de onda e 140-mW de potência. O tempo de aplicação foi de 60 segundos no interior das bolsas. Seis semanas após o tratamento inicial as aferições periodontais foram repetidas e o grupo “C” recebeu novamente a terapia fotodinâmica nos sítios com profundidade de sondagem igual ou maior que 5 mm. Novas aferições foram realizadas 12 semanas depois do tratamento inicial. Diferenças estatisticamente significantes foram encontradas nos grupos tratados com terapia fotodinâmica para a redução de sangramento a sondagem em relação ao grupo controle no período de análise de 12 semanas. Os autores sugerem que a terapia fotodinâmica pode ser usada como coadjuvante no tratamento de bolsas profundas.

Garcia et al. (2013) realizaram um estudo para tratamento de lesão de furca induzida em ratos. Para tanto foi utilizado um laser de baixa potência InGaAlP com comprimento de onda de 660 nm, densidade de energia de 4,94 J/cm^2 e intensidade de 0,035W. Havia um grupo controle tratado somente com solução salina, outro com somente raspagem e vários outros grupos teste com aplicações de terapia fotodinâmica. Comparando o grupo controle com o grupo com somente raspagem houve uma maior perda óssea no primeiro em relação ao segundo. Apesar disso tanto o grupo controle quanto o grupo tratado com somente raspagem resultaram em perdas ósseas maiores em relação aos grupos teste tratados com terapia fotodinâmica, com diferenças estatisticamente significantes. Não houve diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo teste em que foi realizada uma

única aplicação do laser e os outros grupos teste em que mais de uma aplicação foi realizada, independente do intervalo de tempo entre as aplicações.

A susceptibilidade da *Cândida Albicans* à terapia fotodinâmica foi testada por Pupo et al. (2011). Foi usado o laser InGaAIP, com pico de absorbância de 660 nm, densidade de energia de 53J/cm² e intensidade de 40mW. Dois corantes foram testados, Azul de metileno (MB) e azul de toluidina O (TB). Segundo os autores esses corantes tem seu pico de absorção em 665 nm e 635 nm respectivamente. Houve 7 grupos nesse estudo. Os dois primeiros grupos (1 e 2) foram grupos controle e somente nos dois últimos (6 e 7) foi usada a associação do laser e do corante. Os outros grupos apenas usaram um dos corantes (sem o laser) ou o laser (sem o corante). Houve diferenças estatisticamente significantes quanto à contagem de unidades formadoras de colônia quando esses dois últimos grupos foram comparados com os outros grupos.

Qadri et al. (2005) testaram o efeito da aplicação direta do laser de baixa potência (sem a utilização de fotossensitizador) como método auxiliar no tratamento da doença periodontal. Foram convidados a participar desse estudo 17 pacientes com doença periodontal crônica. Medições de parâmetros clínicos foram inicialmente realizadas para profundidade de sondagem, índice gengival e índice de placa. Também foram coletadas amostras do fluido gengival crevicular com a finalidade de se mensurar os níveis de IL-1β, MMP-8 e também o volume do fluido gengival crevicular. Após esses procedimentos, foi realizado raspagem e alisamento radicular em toda a boca. Os grupos de estudo (teste e controle) foram realizados no formato de boca dividida. No grupo teste foram tratados os dentes de um lado da maxila. Foram utilizados dois lasers de diodo com 635 e 830 nm de comprimento de onda e 10 e 70 mW de potencia. O outro lado da maxila (grupo controle) recebeu o laser como placebo. Para isso, foi utilizado um outro laser de diodo com potencia muito baixa. A laserterapia (tanto do laser do grupo teste quanto o placebo) começaram uma semana após as aferições, coletas e preparo inicial no baseline. As laserterapias foram realizadas uma vez por semana por 6 semanas. Novas aferições e coletas foram feitas após o tratamento e os resultados submetidos à análise estatística. Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes, a favor do grupo teste, nas variáveis de índice de placa, índice gengival, profundidade de sondagem e volume do fluido gengival crevicular. Também houve redução dos níveis de MMP-9 embora não fossem estatisticamente significantes. Os autores

sugeriram que os resultados podem ter ocorrido devido aos efeitos do laser na redução de prostaglandina PGE_2 e pela estimulação do ATP celular.

2.4 – A nova proposta da aPDT como agente de condicionamento radicular

Pesquisas recentes do grupo da Periodontia FOB-USP mostram a possibilidade de os corantes para terapia fotodinâmica terem um efeito de desmineralização superficial da raiz, podendo agir como condicionadores radiculares.

Pessoa et al. (2015) publicaram um caso clínico onde o paciente apresentava pigmentações negras nas coroas dentárias oriundas de bactérias de pigmentação negra. Nenhum procedimento de profilaxia obtinha sucesso a longo prazo na remoção dessas manchas. Foi aplicada então a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) com azul de toluidina (10 mg/ml) e laser vermelho 660nm seguida de raspagem com curetas. Não houve recidiva da pigmentação por 7 meses, porém o paciente acusou sensibilidade radicular e apresentou manchas brancas na coroa, as quais foram tratadas com aplicações de flúor.

O trabalho anterior mostrou indícios de que a aPDT poderia causar desmineralização da superfície dentária, o que passou a ser investigado posteriormente.

Damante et al. (2016) mostrou em uma pesquisa *in vitro*, que o corante azul de toluidina O na concentração de 100 µg/ml apresentava pH 4 e foi capaz de desmineralizar dentina e esmalte bovinos. A perda de dureza superficial da dentina pelo corante foi de 71,5%, semelhante àquela provocada pelo ácido cítrico (76,5%), sendo que para o esmalte, foi menor (34,1%) que o ácido (68%). Houve um desgaste de 12,58 µm para o esmalte e 12,19 µm para a dentina semelhantes ao provocado pelo ácido cítrico. Também foram cultivados fibroblastos gengivais humanos sobre a dentina desmineralizada pelo corante. O grupo tratado com azul de toluidina mostrou crescimento celular semelhante ao grupo controle (somente raspagem) e menor que o grupo tratado com ácido cítrico após 72h.

2.5 - Células de granulação óssea (GO)

A técnica do enxerto de granulação óssea foi descrita primeiramente por Passanezi et al. (1989). A técnica consiste na retirada de enxerto ósseo de granulação de um leito, podendo ser esse leito originário de uma extração ou artificialmente formado (PASSANEZI et al., 1989; BARBOSA, 2012). As áreas ao redor do alvéolo estarão ricas em tecido de granulação, com predominância de células de granulação óssea que são pré-osteoblastos e osteoblastos em diversos graus de diferenciação. Após 21 dias da formação do alvéolo cirúrgico (ou da extração) a área deve ser reoperada para a retirada do enxerto. Esse enxerto então é usado para tratamento de defeitos infra-ósseos ou em casos onde há necessidade de regeneração óssea do entorno de uma raiz onde o suporte ósseo periodontal está comprometido (PASSANEZI et al., 1989; BARBOSA, 2012). Quando esse tipo de tecido necessita ser estudado *in vitro* uma pequena parte do enxerto coletado, e que não necessitará ser usado para enxertia no paciente, é então separada e levada para cultivo em laboratório. Penteado et al. (2005) fizeram a caracterização imunohistoquímica dessas células mostrando presença de colágeno tipo 1, osteonectina e sialoproteina óssea. Esses dados confirmaram a natureza osteoblástica dessas células.

O grupo de pesquisa da Periodontia FOB-USP vem estudando o comportamento do enxerto de granulação óssea em pesquisas clínicas e laboratoriais. Um dos trabalhos avaliou o uso da granulação óssea no recobrimento radicular visando à regeneração periodontal (SANT'ANA et al., 2012). Os grupos tratados mostraram redução na profundidade de sondagem, ganho de inserção e redução na recessão. Outro estudo avaliou o padrão de crescimento das células de granulação óssea (GO) obtidas por cultura primária. A curva de crescimento mostrou progressão até o 10º dia com aumento significativo no número de células sugerindo atividade de proliferação e síntese compatíveis com células de linhagem osteoblástica (BARBOSA, 2012). Medina-Valdívia (2013) avaliou a produção de fosfatase alcalina e propriedades de mineralização dessas células. A atividade da fosfatase alcalina foi detectada em quantidades semelhantes quando as células foram cultivadas em meio convencional e osteogênico. Em relação à produção de

nódulos mineralizados, as células foram capazes de produzi-los mesmo em meio convencional, porém quando estimuladas com meio osteogênico, a produção praticamente dobrou. Nesse mesmo trabalho, avaliou-se o efeito do meio condicionado com diferentes membranas de colágeno sobre a proliferação das células GO, sendo que nos períodos mais tardios, as membranas ColaTape® e Genderm® promoveram maior proliferação celular. Karam (2013) mostrou que o meio de cultura condicionado por raízes tratadas com Nd:YAG estimulou a proliferação de células GO de maneira significante maior em relação às tratadas com raspagem, ácido cítrico, laser Er:YAG e terapia fotodinâmica.

3-Proposição

3-Proposição

Esse estudo teve como objetivo investigar a proliferação *in vitro* de células de granulação óssea humanas sobre superfícies radiculares tratadas por raspagem e alisamento radicular, terapia fotodinâmica antimicrobiana, ácido cítrico e EDTA.

4-Material e Métodos

4-Material e Métodos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da FOB-USP (Parecer nº 579.436).

4.1 – Preparo dos fragmentos radiculares

Foram coletados 24 dentes extraídos por motivo periodontal na clínica de periodontia e cirurgia da FOB-USP. Os pacientes assinaram um termo de doação de dentes aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da FOB.

Com o auxílio de um disco de carborundum foram obtidos dois fragmentos da raiz de cada dente. Os fragmentos foram preparados com as seguintes medidas: 4 mm de comprimento, 2 mm de altura e 2 mm de espessura. A parte interna do fragmento, que corresponde à parte interna do dente, normalmente se fazia presente no fragmento com uma leve curvatura que corresponde ao canal radicular. Esse detalhe serviu como guia para que se pudesse realizar o tratamento na superfície do lado oposto, isso é, a porção da raiz que estava voltada para a bolsa periodontal. Quando essa curvatura do canal não esta tão evidente uma marcação com broca foi realizada no local (Figura 2) (KARAM, 2013).

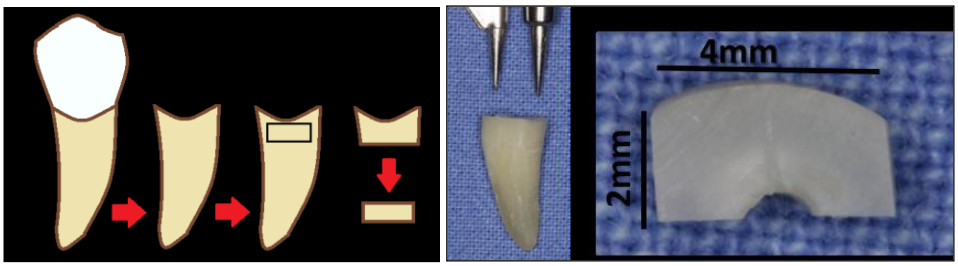

Figura 2: Modo de obtenção dos fragmentos dentais (KARAM, 2013).

No total foram utilizados 48 fragmentos. Após a realização dos cortes, todos os fragmentos foram submetidos a 20 golpes de cureta (Gracey número 5-6, Hu-

Friedy). Feito isso, os fragmentos foram armazenados em frascos com soro fisiológico estéril e mantidos em geladeira.

4.2 – Grupos experimentais

Os grupos experimentais foram divididos da seguinte forma:

RAR – Raspagem e alisamento radicular com 20 golpes de cureta.

PDT – Terapia fotodinâmica antimicrobiana com azul de toluidina O e laser vermelho. Aplicação passiva. Os fragmentos foram mergulhados no corante e irradiados após 1 minuto de imersão.

AC – Ácido cítrico 50% + tetraciclina 1% em pH 1. Aplicação passiva por 3 minutos.

EDTA - EDTA gel trissódico 24% (Biodinâmica). Aplicação passiva por 3 minutos.

No grupo PDT, o laser aplicado foi o Thera Lase® (D.M.C. Equipamentos Ltda, São Carlos/ Brasil) com os parâmetros descritos no quadro 1 (SALMERON, 2013).

Comprimento de onda	***Potência***	***Densidade de Energia***	***Modo de emissão***	***Modo de aplicação***	***Tempo de exposição***
660 nm (vermelho)	*30 mW*	*45 J/cm²*	*Contínuo*	*Varredura*	*30s*

Quadro 1 (SALMERON., 2013)

Após os tratamentos, os fragmentos foram lavados com soro fisiológico por 30s e levados para nova esterilização em autoclave, procedimento necessário para evitar contaminação da cultura de células.

4.3 Cultura de células

Para este estudo foi utilizada a linhagem celular de osteoblastos denominada granulação óssea (GO) estabelecida a partir da cultura primária de tecido ósseo em formação de um alvéolo após 28 dias da exodontia (PASSANEZI et al.; 1989, SANT'ANA et al., 2012; BARBOSA, 2012). A linhagem foi mantida em nitrogênio líquido.

Após descongelamento, as células foram cultivadas em meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica-antimicótica. As células foram incubadas em ambiente úmido, a 37ºC, numa atmosfera contendo 95% de ar e 5% de dióxido de carbono. Para o experimento de proliferação, os fragmentos foram colocados em placas de 24 poços.

Foram plaqueadas 10^4 células por poço (em quadruplicata), na 5ª passagem, as quais permaneceram incubadas pelos períodos experimentais de 24h, 48h e 72h. Os espécimes foram fixados para a realização e análise em microscopia eletrônica de varredura através de banhos em tampão Karnovsky, banho de tetróxido de ósmio, diluições crescentes de acetona e cobertas com ouro por "sputtering".

Todos os fragmentos foram fotografados no microscópio eletrônico de varredura com distância focal de 8 a 19 mm e aumento de 500X. Essa etapa foi realizada no microscópio eletrônico de varredura Personal SEM® eXpress (Delmont, Pennsylvania, USA) adquirido por processo FAPESP 12/06738-9 para a FOB-USP. Foram obtidas eletromicrografias de cinco áreas de cada fragmento assim localizadas: centro, campo superior direito, campo inferior direito, campo inferior esquerdo e campo superior esquerdo com o objetivo de abranger as mesmas áreas de todos os fragmentos. Sobre estas eletromicrografias foi sobreposta uma grade quadriculada para orientar a contagem das células aderidas sobre às superfícies. Quando as células cobriram a superfície a ponto de impedir sua contagem individual, o maior número obtido por contagem foi repetido (FEIST et al., 2003).

Um examinador cego e calibrado (CAD) realizou as contagens. Para sua calibração, 30% da amostra, sem legenda, foi contada 2 vezes com 15 dias de intervalo.

4.4 Análise estatística

A análise da calibração do examinador foi feita através de uma combinação de testes estatísticos como erro casual de Dahlberg, erro sistemático e correlação de Pearson ($p<0,05$).

A análise da amostra foi realizada através do ANOVA de medidas repetidas complementado por Tukey, com nível de significância de 5% ($p<0,05$).

5-RESULTADOS

5-RESULTADOS

As análises de calibração do examinador mostraram ótima calibração entre as contagens com o erro casual de Dahlberg = 1,08, ou seja, a margem de erro foi de aproximadamente 1 célula. O erro sistemático com p=0,308 mostrou ausência de diferenças entre as contagens e a correlação de Pearson com r=0,90 mostrou altíssima correlação entre as contagens. Todos esses dados em conjunto, mostraram ótima calibração do examinador.

Em relação ao número de células, notou-se um crescimento celular ao longo do tempo apenas para o grupo PDT e com diferenças estatisticamente significantes apenas no período de 72h (p<0,05). Na comparação entre os grupos, houve um maior número de células apenas para o grupo PDT (p<0,05) não havendo diferenças entre os outros grupos (p>0,05). (Figura 3)

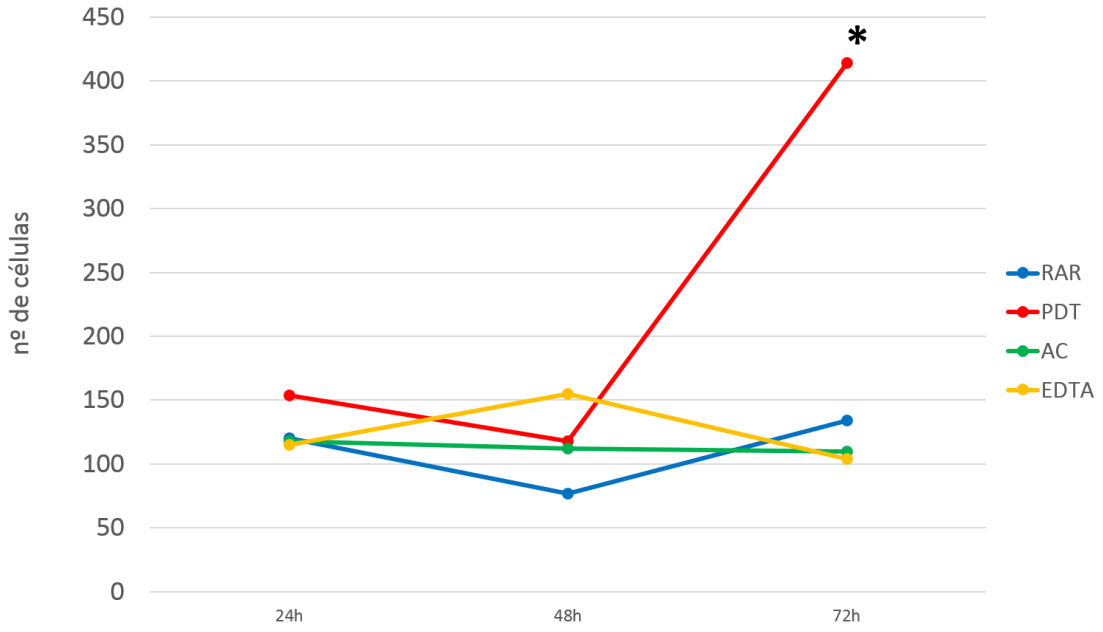

Figura 3 – Número total de células por grupo ao longo do tempo. RAR – raspagem e alisamento radicular, PDT – terapia fotodinâmica com azul de toluidina O, AC – ácido cítrico com tetraciclina, EDTA. * = p<0,05 em relação aos outros grupos e períodos.

A figura 4 mostra as imagens de microscopia eletrônica de varredura ao longo do tempo para todos os grupos. Nota-se que no grupo PDT, no período de 72h, as

células estão mais espalhadas cobrindo quase toda a superfície tratada (área dentro dos retângulos), o que denota uma afinidade por essa superfície.

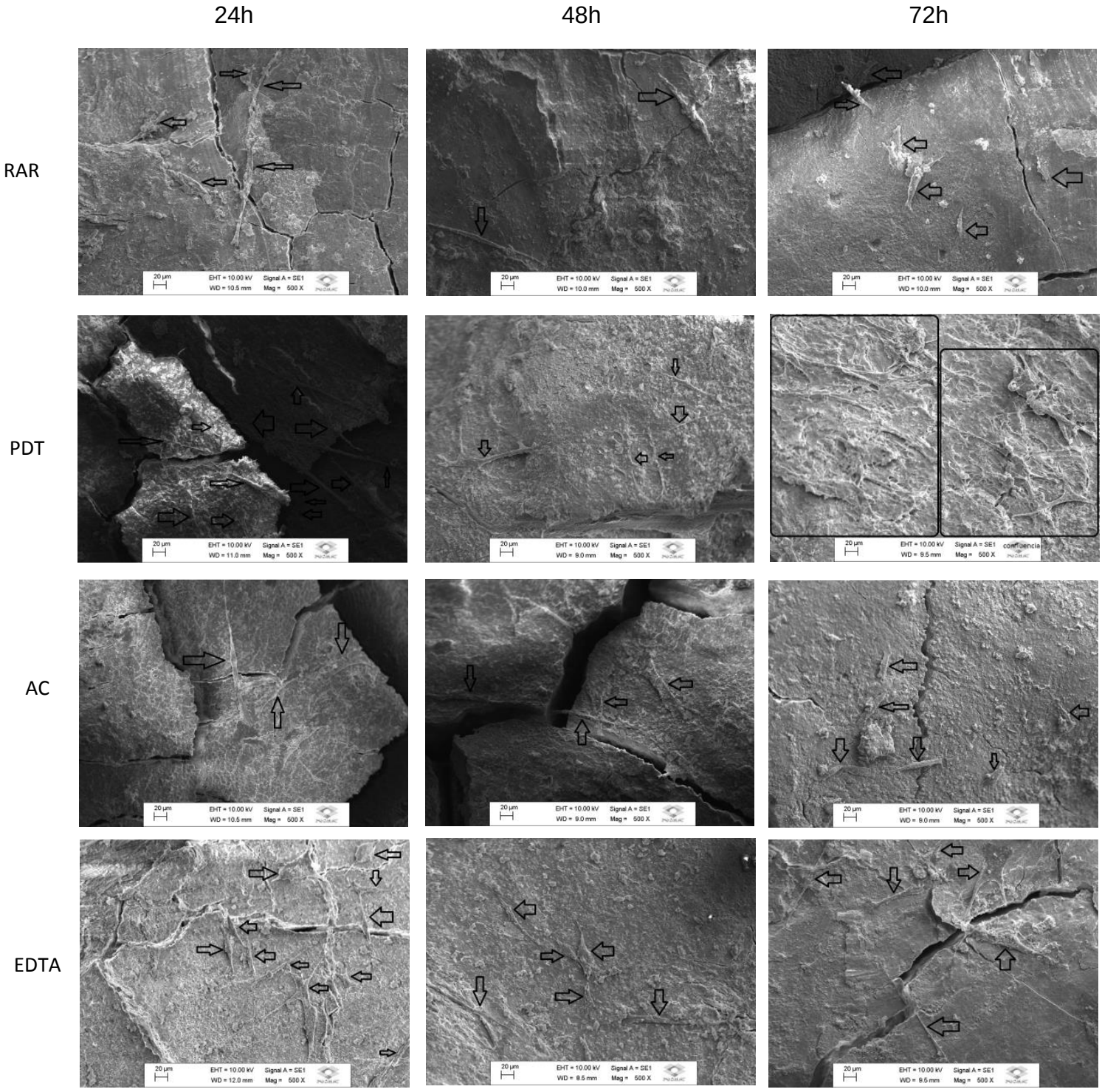

Figura 4: Fotos de Microscopia Eletrônica de Varredura. Aumento de 500X. As setas indicam locais ocupados por células. Os retângulos na amostra do grupo PDT 72h mostram áreas da superfície totalmente preenchidas por células.

6-Discussão

6-Discussão

A utilização da terapia fotodinâmica com azul de toluidina como método complementar de terapia periodontal possui grandes vantagens. Boa tolerância biológica de tecidos moles ao azul de toluidina já é consagrada tanto na área médica (FERREIRA, 2015) quanto odontológica (CALANDRO et al., 2011). Se a hipersensibilidade dentária foi uma ocorrência clínica no artigo que deu origem a estudos com desmineralização pelo azul de toluidina (PESSOA et al., 2015) há de se considerar que, naquele estudo, foi usada uma concentração 100 vezes superior (azul de toluidina a 1%) à usada atualmente no presente trabalho e pela nossa equipe de pesquisa (azul de toluidina a 0,01% ou 100µm/ml). Excelentes resultados *in vitro* e em modelos animais usando o de azul de toluidina a 0,01% já foram comprovados, não só contra patógenos periodontais como *Porphyromonas gingivalis,* mas também contra o *Streptococcuss mutans (*KÖMERIK et al*.,* 2003*;* HAKIMIHA et al*.,* 2014*).* Um estudo *in vivo* em humanos também demonstrou ótimos resultados para desinfecção de patógenos em pacientes com periodontite crônica usando o azul de toluidina na concentração de 100µm/ml (THEODORO et al., 2012). O artigo de Damante et al. (2016) demostrou que o azul de toluidina a 100µm/ml provocou menor alteração de microdureza no esmalte dentário que o ácido cítrico (DAMANTE et al., 2016). Isso é de grande relevância para a periodontia uma vez que a ação desse tipo de condicionamento radicular pode atuar, com menor efeito colateral no esmalte. Se na atuação clínica o corante vier a tocar no esmalte durante uma aplicação de aPDT, seus efeitos nessa concentração provavelmente seriam menos danosos do que o ácido cítrico. É necessário ainda citar que em estudo clínico usando o azul de toluidina a 100µm/ml não foi relatado qualquer alteração de hipersensibilidade nos pacientes tratados (THEODORO et al., 2012). O presente estudo corrobora com os trabalhos clínicos e laboratoriais e dá embasamento a cerca do uso, eficácia e aplicabilidade do azul de toluidina na terapia fotodinâmica como coadjuvante da raspagem e do alisamento radicular nessa concentração.

Atualmente o número de estudos de cultivo de células ósseas sobre superfícies dentais é relativamente escasso. A maioria dos artigos se refere ao cultivo de fibroblastos gengivais ou de células do ligamento periodontal. Este é provavelmente o primeiro estudo de cultivo células de linhagem óssea sobre

superfícies dentais tratadas com azul de toluidina em terapia fotodinâmica. Fardal e Lowenberg (1990) conseguiram resultados favoráveis *in vitro* para a adesão celular de fibroblastos em raízes de dentes extraídas por problemas periodontais e tratadas com raspagem e aplicação de ácido cítrico. Também Zaman et al. (2000) obtiveram bons índices de adesão celular de fibroblastos em fragmentos de raízes tratadas com ácido cítrico e EDTA, em experimento de cultura de células. Um detalhe importante no trabalho de Zaman et al. (2000) foi que os tratamentos de superfície (aplicação de ácido cítrico e EDTA) foram realizados tanto sobre dentina quanto sobre cemento e as alterações nos índices de adesão sobre essas duas superfícies se mantiveram semelhantes em ambas as superfícies.

O trabalho de Cogen, Garrison e Weatherford (1983) também demonstrou resultados semelhantes. Seu trabalho com cultura de células demostrou não haver diferenças na viabilidade celular de fibroblastos expostos a raízes de dentes extraídos por comprometimento periodontal, independente de terem sido previamente tratadas ou não. O mesmo trabalho demonstrou, porém, que a adesão e crescimento celular só se faz viável em raízes que receberam raspagem radicular previamente. Faz-se importante destacar que para a avaliação de adesão sobre a superfície radicular o trabalho levou em conta apenas a capacidade de retenção de um corante celular sobre a superfície radicular, que foi analisado visualmente. Em raízes onde a raspagem não foi previamente realizada não houve retenção de corante enquanto que raízes previamente raspadas foram coradas. Nesse artigo havia tanto a presença de um grupo tratado com somente raspagem quanto a presença de um grupo tratado com raspagem seguida da aplicação de ácido cítrico. O artigo afirma que os resultados adesão celular desses dois grupos foi melhor em relação aos outros cujas raízes não receberam raspagem prévia, mas não foi capaz de distinguir internamente qual desses grupos (raspagem ou raspagem seguida de ácido cítrico) obteve melhores resultados de adesão e crescimento celular. O estudo de Damante et al. (2016) conseguiu melhores resultados de proliferação de fibroblastos com tratamento de superfície com ácido cítrico em relação ao grupo de tratamento com terapia fotodinâmica. É preciso considerar porém que naquela pesquisa as superfícies dos dentes foram tratadas com o auxílio de um microbrush o que diferenciou do presente estudo em que os fragmentos foram imersos na solução corante.

Apenas dois artigos que tratam sobre a cultura celular de osteoblastos sobre raízes dentais foram localizados. Um deles, que usou raízes de dentes extraídos por doença periodontal, afirma que a adesão e o crescimento celular de osteoblastos sobre superfície radiculares pode ser melhorada pelo condicionamento prévio com ácido cítrico (ZHANG; LIU, 1998). Outro artigo (SCHWARTZ et al., 2000) mostrou melhores resultados de proliferação de osteoblastos sobre superfícies dentais tratadas com polimento seguido de aplicação de tetraciclina (TNC). Além do tratamento radicular com tetraciclina havia outro grupo tratado com polimento radicular seguido de exposição a uma cultura de células de osteoclastos (OC). Os resultados, em geral, demostraram que o grupo previamente submetido à exposição de cultura de osteoblastos respondeu de forma um pouco menos intensa, inclusive quanto à proliferação celular, ao grupo de dentes tratados com tetraciclina. A análise microscópica do grupo OC mostrou a formação de pequenas crateras na superfície radicular que ocupava cerca de 3,7% da superfície. Essas regiões foram os locais preferencialmente ocupados pelos osteoblastos. Os autores sugeriram que a tendência para respostas semelhantes do grupo OC em relação ao grupo TNC se deram pela possível existência fibras colágenas e fatores de crescimento nessas regiões de crateras. Sugeriram ainda que, independente da forma de tratamento utilizados no grupo teste, a desmineralização foi importante para obtenção das respostas celulares e que a rugosidade deve desempenhar também algum papel nesse processo já que, visualmente, essas crateras se mostravam mais rugosas que o resto das superfícies e os osteoblastos ocuparam preferencialmente essas áreas.

Postlethwaite, Seyer e Kang (1978) demonstraram que fibroblastos podem sofrer quimioatração por certos tipos de colágeno e por peptídeos derivados destes. Os autores sugeriram que os tipos de colágeno 1, 2 e 3 compartilham o mesmo receptor para a quimioatração de fibroblastos. O trabalho de cultura de células Schwartz et al. (2000) realizou análise da composição de elementos atômicos da superfície de dentes tratados por diferentes agentes condicionadores. O grupo no qual houve a maior proliferação de células ósseas demonstrou grande quantidade de carbono em sua superfície o que era um forte indício de grande presença de fibras colágenas na superfície. Os autores sugeriram que os maiores resultados de proliferação celular foram devidos a esse fato. Outro trabalho *in vitro* cultivou células ósseas sobre uma bases parcialmente compostas de colágeno e constataram que proliferação celular era alterada em razão da proporção de

colágeno que essas bases continham (SCOTCHFORD et al., 1998). Esses estudos indicam fortemente que há evidencias que de que a presença de colágeno pode alterar a proliferação celular de células ósseas. Alguns trabalhos afirmam que o condicionamento radicular com ácido cítrico pode, além de alterar a superfície mineralizada da dentina, remover e danificar também as fibras colágenas expostas pela desmineralização (BLOMLÖF; LINDSKOG, 1995). Poderíamos especular que, na presente pesquisa, o ácido pode ter prejudicado e alterado os componentes do colágeno que se ligam a superfície das células de granulação e, dessa forma, ter prejudicado a resposta celular no grupo tratado com ácido cítrico. Sabe-se também que o acido cítrico pode ter efeitos negativos sobre a adesão e proliferação celular (LAN et al., 1999). Embora a irrigação pós-condicionamento ácido tenha removido boa parte do ácido, não se sabe ao certo se houve resquícios sobre a superfície dental e se esses resquícios puderam interferir na proliferação celular.

Um outro ponto a considerar diz respeito à rugosidade da superfície dentária provocada pelos agentes. Foi sugerido que superfícies rugosas são preferíveis para a adesão e crescimento de células ósseas (SCHWARTZ et al., 2000). Na área da implantodontia esse fato fica ainda mais evidente. Citamos a área de implantodontia pois a seu campo de estudo com o tecido ósseo em muito se assemelha com as células de granulação óssea que nada mais são do que osteoblastos em formação. Sabe-se que implantes com superfícies com certa rugosidade possuem melhor prognóstico do que implantes com superfícies lisas (SANTOS, 2007). Não esta muito bem esclarecido qual a rugosidade ideal pra proliferação de osteoblastos. É de conhecimento porém que o EDTA tem menor poder de alteração da superfície dentaria do que o ácido cítrico. Trabalhos que analisaram e comparam a rugosidade de superfície após o condicionamento radicular apontam uma menor rugosidade para condicionamento com EDTA em relação ao condicionamento com outros agentes, entre eles o ácido cítrico (ELDENIZ; ERDEMIR; BELLI, 2005; BALLAL; MALA; BHAT, 2010).

Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, utilizando o azul de toluidina a 100µm/ml, demostraram que a solução possui um valor de PH 4 (DAMANTE et al., 2016). Como demostrado por certos estudos, esse valor é consideravelmente maior que o valor do PH usado para o condicionamento radicular com ácido e cítrico (normalmente PH 1) (DAMANTE et al., 2016) e, obviamente menor que o PH do EDTA cujo PH é neutro. Apesar de não termos nos focado nos

aspectos das alterações de superfície em nossa pesquisa poderíamos, para uma possível explicação para o sucesso no grupo da terapia fotodinâmica, sugerir que o azul de toluidina não degradou as fibras colágenas como o ácido cítrico e ao mesmo tempo e da forma oposta do que ocorreu com o EDTA, foi capaz de alterar suficientemente a rugosidade da superfície dentária e com isso, combinou os fatores necessários para o aumento de adesão e proliferação celular.

Outro aspecto a ser considerado, e que difere o tratamento de superfície com terapia fotodinâmica dos outros grupos consiste no fato de que os fragmentos foram imersos na solução de azul de toluidina enquanto que, nos outros grupos, o condicionamento radicular foi realizado apenas na superfície do fragmento que seria exposta ao cultivo celular. Após a retirada dos fragmentos da solução de corante e mesmo após a irrigação com soro fisiológico, os fragmentos tratados com terapia fotodinâmica se diferenciavam dos outros pela cor azul. Este fato nos levou a especular se o corante não se impregnou mais profundamente na superfície dental que os outros agentes de condicionamento nos outros grupos de tratamento. Isso pode ser de grande relevância pois se sabe que as endotoxinas podem se infiltrar profundamente na superfície dental. Seguindo essa linha de raciocínio, poderíamos lançar a hipótese de que o azul de toluidina penetrou por entre os canalículos dentinários e assim, impregnou as endotoxinas em seu interior. Um Estudo laboratorial demonstrou que o azul de toluidina pode se aderir fortemente ao LPS (USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2003). Sabe-se que o LPS pode interferir na resposta celular do tecido ósseo (HAISHIMA et al., 2016). A partir das observações de nossa pesquisa poderíamos lançar a hipótese de que a união LPS-azul de toluidina tornou o LPS inativo ou diminuiu sua ação de provocar dano celular e isso poderia ter aumentado o crescimento celular do grupo tratado com terapia fotodinâmica em relação aos outros grupos.

O raciocínio contrário vale para os outros grupos pelo fato dos agentes de condicionamento radicular terem sido aplicados na forma de gel, o que reduz consideravelmente a penetração dos produtos. Somos da opinião de que um agente de condicionamento radicular que penetre e impregne profundamente a dentina radicular poderia apresentar uma maior relevância clínica no tratamento de raízes acometidas pela doença periodontal. Se não é possível, clinicamente, realizar a imersão *in vivo* em paciente com dentes íntegros, é possível a aplicação do corante dentro da câmara pulpar de dentes com tratamento endodôntico. Talvez

esse procedimento, conjuntamente com a aplicação convencional sobre a superfície radicular possa ser um auxiliar na desinfecção de dentes periodontalmente comprometidos. Sugerimos que esta poderia ser uma boa área de especulação para pesquisas posteriores.

Nosso estudo foi laboratorial. Não pretendíamos com a terapia fotodinâmica, realizar a desinfecção dos patógenos vivos na superfície radicular uma vez que os fragmentos devem ser esterilizados antes da cultura de células para evitar contaminação da cultura. Apesar disso, poderá haver uma relevância clínica para seu uso em conformidade com os resultados de nossa pesquisa. Partindo do princípio que, teoricamente, o uso do fotossensitizador pode condicionar a superfície radicular e estimular a proliferação de osteoblastos, isso pode ser de grande importância em tratamento regenerativos de lesões ou bolsas infra- ósseas. Se é verdade que outros agentes de condicionamento radicular poderiam de certa forma cumprir a tarefa desmineralização e exposição das fibras colágenas e ligantes de superfície, também é fato que não teriam tanta eficácia como a terapia fotodinâmica na desinfecção de patógenos vivos do local. A terapia fotodinâmica poderia ser uma alternativa mais viável nesses casos pois abrangeria, concomitantemente, o condicionamento radicular e uma melhor desinfeção nessas áreas de lesão.

7-Conclusão

7-Conclusão

A terapia fotodinâmica antimicrobiana, utilizada como agente de condicionamento radicular após raspagem, favorece a proliferação de células de granulação óssea humanas *in vitro*.

Referências

Referências

Adriaens PA, Edwards CA, De Boever JA, Loesche WJ. Ultrastructural observations on bacterial invasion in cementum and radicular dentin of periodontally diseased human teeth. J Periodontol. 1988; 59(8):493-503.

Alger FA, Solt CW, Vuddhakanok S, Miles K. The histologic evaluation of new attachment in periodontally diseased human roots treated with tetracycline-hydrochloride and fibronectin. J Periodontol. 1990 Jul; 61(7):447-55.

Aoki A, Sasaki KM, Watanabe H, Ishikawa I. Lasers in nonsurgical periodontal therapy. Periodontol 2000. 2004; 36: 59-97.

Albair WB, Cobb CM, Killoy WJ. Connective tissue attachment to periodontally diseased roots after citric acid demineralization. J Periodontol. 1981; 53(8): 515-26.

Baker PJ, Evans RT, Coburn RA, Genco RJ. Tetracycline and its derivatives strongly bind to and are released from the tooth surface in active form. J Periodontol. 1983 Oct; 54(10): 580-5.

Ballal NV, Mala K, Bhat KS. Evaluation of the effect of maleic acid and ethylenediaminetetraacetic acid on the microhardness and surface roughness of human root canal dentin. J Endod. 2010 Aug; 36(8):1385-8.

Barbosa FA. Cultura primária e caracterização de células do tecido de granulação óssea (técnica do enxerto ósseo em neoformação) [monografia – graduação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2012.

Blomlöf JP, Blomlöf LB, Lindskog SF. Smear removal and collagen exposure after non-surgical root planing followed by etching with an EDTA gel preparation. J Periodontol. 1996 Sep; 67(9): 841-5.

Blomlöf J, Lindskog S. Root surface texture and early cell and tissue colonization after different etching modalities. Eur J Oral Sci. 1995 Feb;103(1):17-24.

Boyko GA, Brunette DM, Melcher AH. Cell attachment to demineralized root surfaces in vitro. J Periodontal Res. 1980 May; 15 (3): 297-303.

Calandro TLL, Werneck JT, Gonçalves SSA, Júnior AS, Dias EP. Utilização do teste com o azul de toluidina como método auxiliar no diagnóstico de lesões orais. Rev. bras. Odontol. 2011; 68(2): 196-9.

Chondros P, Nikolidakis D, Christodoulides N, Rössler R, Gutknecht N, Sculean A. Photodynamic therapy as adjunct to non- surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. Lasers Med Sci. 2009 Sep; 24 (5): 681-8.

Cogen RB, Garrison DC, Weatherford TW. Effect of various root surface treatments on the viability and attachment of human gingival fibroblasts. J Periodontol. 1983 May; 54 (5): 277-82.

Common J, McFall WT Jr. The effects of citric acid on attachment of laterally positioned flap. J Periodontol. 1983 Jan; 54 (1): 9-18.

Damante CA, Ducati P, Ferreira R, Salmeron S, Zangrando MS, de Rezende ML, et al. In vitro evaluation of adhesion/proliferation of human gingival fibroblasts on demineralized root surfaces by toluidine blue O in antimicrobial photodynamic therapy. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2016 Mar; 13: 303-7.

Eberhard J, Ehlers H, Falk W, Açil Y, Albers HK, Jepsen S. Efficacy of subgingival calculus removal with Er:YAG laser compared to mechanical debridement: an in situ study. J ClinPeriodontol. 2003; 30 (6): 511-8.

Eldeniz AU, Erdemir A, Belli S. Effect of EDTA and citric acid solutions on the microhardness and the roughness of human root canal dentin. J Endod. 2005 Feb; 31 (2): 107-10.

Emingil G, Atilla G, Sorsa T, Luoto H, Kirilmaz L, Baylas H. The effect of adjunctive low-dose doxycycline therapy on clinical parameters and gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels in chronic periodontitis J Periodontol. 2004 Jan; 75 (1): 106-15.

Fardal O, Lowenberg BF. A quantitative analysis of the migration, attachment, and orientation of human gingival fibroblasts to human dental root surfaces in vitro. J Periodontol. 1990 Aug; 61(8): 529-35.

Feist IS, De Micheli G, Carneiro SRS, Eduardo CP, Myiagi SPH, Marques MM. Adhesion and growth of cultured human gingival fibroblast and periodontally involved root surfaces treated by Er:YAG laser. J Periodontol. 2003; 74 (9):1368-75.

Ferreira R. Terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento da doença periodontal em pacientes com síndrome de Down [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2015.

Frank RM, Fiore-Donno G, Cimasoni G. Cementogenesis and soft tissue attachment after citric acid treatment in a human. An electron microscopic study. J Periodontol. 1983; 54 (7): 389-401.

Foote CS. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. Photochem. Photobiol. 1991; 54: 659

Ge L, Shu R, Li Y, Li C, Luo L, Song Z, et al. Adjunctive effect of photodynamic therapy to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis. Photomed Laser Surg. 2011 Jan; 29 (1): 33-7.

George RP, Kumar S, Ramakrishna T, Emmadi P, Ambalavanan N. Effects of tetracycline-containing gel and a mixture of tetracycline and citric acid-containing gel on non-surgical periodontal therapy. Indian J Dent Res. 2013; 24 (1): 52-59.

Gamal AY. Enhanced β-tricalcium phosphate blended clot adhesion to EDTA biomodulated periodontally affected root surfaces: in vivo scanning electron microscopy evaluation. J Periodontol. 2011 Nov; 82 (11): 1587-95.

Garcia VG, Longo M, Fernandes LA, Gualberto EC Jr, SantinoniCdos S, Bosco AF, et al. Treatment of experimental periodontitis in rats using repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy. Lasers Med Sci. 2013; 28(1):143-50.

Garret JS, Crigger M, Egelberg. Effects of citric acid on diseased Root surfaces. J Periodontal Res. 1978; 13: 155-163.

Haishima Y, Hasegawa C, Todoki K, Sasaki K, Niimi S, Ozono S. A biological study establishing the endotoxin limit of biomaterials for bone regeneration in cranial and femoral implantation of rats. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2016 Apr 27. [Epub ahead of print]

Hakimiha N, Khoei F, Bahador A, Fekrazad R. The susceptibility of Streptococcus mutans to antibacterial photodynamic therapy: a comparison of two different photosensitizers and light sources. J Appl Oral Sci. 2014 Apr; 22 (2): 80-4.

Hatfield CG e Baumhammers A. Cytotoxic effects of periodontally involved surfaces of human teeth. Archs oral Biol. 1971; 16: 465-468.

Karam PSBH. Influência de raízes tratadas quimicamente e com laser sobre a proliferação de fibroblastos gengivais humanos e granulação óssea [Dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2013.

Kömerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. In vivo killing of Porphyromonas gingivalis by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. Antimicrob Agents Chemother. 2003 Mar;47(3):932-40.

Lan WC, Lan WH, Chan CP, Hsieh CC, Chang MC, Jeng JH. The effects of extracellular citric acid acidosis on the viability, cellular adhesion capacity and protein synthesis of cultured human gingival fibroblasts. Aust Dent J. 1999 Jun;44(2):123-30.

Lulic M, Leiggener Görög I, Salvi GE, Ramseier CA, Mattheos N, Lang NP. One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized-controlled clinical trial. J Clin Periodontol. 2009; 36: 661–666.

Mayfield L, Söderholm G, Norderyd O, Attström R. Root conditioning using EDTA gel as an adjunct to surgical therapy for the treatment of intraosseous periodontal defects. J Clin Periodontol. 1998 Sep; 25(9):707-14.

Medina-Valdívia MA. Cultura e caracterização de células da granulação óssea in vitro: efeitos proliferativos estimulados por diferentes biomateriais. [Dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2013.

Passanezi E, Janson WA, Nahas D, Campos Jr A. Newly Forming Bone Autografts to Treat Periodontal Infrabony Pockets: Clinical and Histological Events. Int J Periodontics Restorative Dent. 1989; 9(2):140-53.

Penteado R, Romito GA, Pustiglioni F, Marques MM. Morphological and proliferative analysis of the healing tissue in human alveolar sockets covered or not by an e-PTFE Membrane: A preliminary immunohistochemical and ultrastructural study. Braz J Oral Sci. 2005 Jan/Mar;4(12):664-9.

Pessoa L, Galvão V, Damante C, Sant'Ana AC. Removal of black stains from teeth by photodynamic therapy: clinical and microbiological analysis. BMJ Case Rep. 2015 Dec 23.

Pitaru S, Melcher AH. Organization of an oriented fiber system in vitro by Human gingival fibroblasts attached to dental tissue: Relationship between cells and Mineralized and demineralized tissue. Journal of Periodontal Research. 1987; 22: 6-13.

Poison AM, PP Michel. Fibrin Linkage: A Precursor for New Attachment. J Periodontol. 1983 Mar;54(3):141-7.

Postlethwaite AE, Seyer JM, Kang AH. Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, and III collagens and collagen-derived peptides. Proc Natl Acad Sci U S A. 1978 Feb;75(2):871-5.

Pupo YM, Gomes GM, Santos EB, Chaves L, Michel MD, Kozlowski VA Jr, et al. Susceptibility of Candida albicans to photodynamic therapy using methylene blue and toluidine blue asphotosensitizing dyes. ActaOdontolLatinoam. 2011;24(2):188-92.

Qadri T, Miranda L, Tunér J, Gustafsson A. The short-term effects of low-level lasers as adjunct therapy in the treatment of periodontal inflammation. J Clin Periodontol. 2005; 32: 714–719.

Salmeron S. Efeitos do laser em baixa intensidade, da terapia fotodinâmica e do azul de toluidina O na descontaminação de superfícies de implantes metálicos. Estudo microscópico em subcutâneo de ratos. [Dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo; 2013

Sampaio JEC, Fontanari LA, Pinto SCS, Cavassim R. Biomodificação Radicular: Uma Revisão de Literatura. R. Periodontia. Dezembro 2009; 19 (04): 37-43.

Sant’Ana ACP, Ferraz BFR, Rezende MLR, Greghi SLA, Damante CA, Passanezi E. A novel surgical approach to the treatment of denuded roots: presentation of the technique. J Appl Oral Sci 2012; 20(3): 392-8.

Santos MV. Efeito da Rugosidade Superficial e da Conicidade na Estabilidade Primária de Implantes Dentários. [Dissertação]. Rio de Janeiro(RJ): Instituto Militar de Engenharia; 2007.

Schwartz Z, Lohmann CH, Wieland M, Cochran DL, Dean DD, Textor M, et al. Osteoblast proliferation and differentiation on dentin slices are modulated by pretreatment of the surface with tetracycline or osteoclasts. J Periodontol. 2000 Apr; 71(4): 586-97.

Scotchford CA, Cascone MG, Downes S, Giusti P. Osteoblast responses to collagen-PVA bioartificial polymers in vitro: the effects of cross-linking method and collagen content. Biomaterials. 1998 Jan-Feb;19(1-3):1-11.

Silva AC, Moura CC, Ferreira JA, Magalhães Dd, Dechichi P, Soares PB. Biological Effects of a Root Conditioning Treatment on Periodontally Affected Teeth - An In Vitro Analysis. Braz Dent J. 2016 Apr;27(2):160-8.

Soukos N.S., Goodson J.M. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. Periodontol 2000. 2011; 55: 143-166

Takasaki A.A., Aoki A., Mizutani K., Schwarz F., Sculean A., Wang C.Y., et al. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. Periodontol 2000. 2009; 51: 109-140

Theodoro LH, Silva SP, Pires JR, Soares GH, Pontes AE, Zuza EP, et al. Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. Lasers Med Sci. 2012 Jul; 27(4):687-93.

Tüter G, Serdar M, Kurtiş B, Walker SG, Atak A, Toyman U, et al. Effects of scaling and root planing and subantimicrobial dose doxycycline on gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinase-8, -13 and serum levels of HsCRP in patients with chronic periodontitis. J Periodontol. 2010 Aug;81(8):1132-9

Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. The interaction of lipopolysaccharides with phenothiazine dyes. Lasers Surg Med. 2003;33(5):311-9.

Walsh LJ. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. Aust Dent J. 1997 Aug;42(4):247-54.

Wikesjö UM, Claffey N, Christersson LA, Franzetti LC, Genco RJ, Terranova VP, et al. Repair of periodontal furcation defects in beagle dogs following reconstructive surgery including root surface demineralization with tetracycline hydrochloride and topical fibronectin application. J Clin Periodontol. 1988 Jan;15(1):73-80.

Wilson M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related disease.Int Dental J 1994;44:181–189.

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

Zhang WG, Liu Z. The effects of fluoride and dexamethasone on the phenotypic development of osteoblast grown on the demineralized dental root surface. Shanghai Kou Qiang Yi Xue. 1998 Jun; 7(2): 99-103.

Anexos

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU-USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeitos do tratamento da superfície radicular por lasers em alta intensidade e terapia fotodinâmica na proliferação de células de granulação óssea humana

Pesquisador: Renato Taddei de Toledo Barros

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 27557514.0.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo

Patrocinador Principal: FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 579.436

Data da Relatoria: 26/03/2014

Apresentação do Projeto:

Segundo o pesquisador, a técnica do enxerto de granulação óssea tem demonstrado bons resultados na recuperação do periodonto e na melhora dos parâmetros clínicos dos dentes com comprometimento periodontal. Pouco se sabe porém, a respeito de qual tipo de tratamento de superfície radicular se faz mais condizente com emprego dessa técnica. Desta forma, o objetivo dessa pesquisa será avaliar a proliferação de células de granulação óssea sobre fragmentos radiculares com os seguintes tratamentos de superfície: Controle - somente raspagem, laser de Er:YAG (10pps, 60mJ, distância focal 12 mm, varredura,10Hz, 10s, 2940nm), laser de Nd:YAG (10s, 0,5W, 15Hz, contato,1640nm), terapia fotodinâmica (laser de InGaAlP - 30mW, 30s, 45J/cm²,660nm + azul de toluidina), e ácido cítrico com tetraciclina. Para realização da pesquisa serão utilizados 30 dentes extraídos por motivo periodontal, bem como células de granulação óssea armazenada em nitrogênio líquido no Laboratório de cultivo celular da disciplina de Bioquímica da FOB-USP. Para obtenção dos resultados, será usado o teste ANOVA complementado por Tukey ou o teste Kruskall-Wallis complementado por Dunn, adotado um nível de significância de 5%.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo de nossa pesquisa será analisar a proliferação de células de granulação óssea sobre a superfície de fragmentos dentais tratados com somente raspagem e alisamento radicular, gel de

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

ácido cítrico com tetraciclina, laser de Er:YAG, laser Nd:YAG e terapia fotodinâmica com laser de InGaAlP e azul de toluidina O.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não há riscos.

Benefícios:

Os testes com diversas formas de condicionamento radicular poderão lançar nova luz no compreendimento do comportamento das células de granulação óssea, visando uma otimização dos resultados com regeneração óssea e periodontal. Os resultados obtidos em laboratório poderão ajudar a alcançar resultados ainda melhores que os já existentes para a técnica do enxerto de granulação óssea.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não há.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos foram apresentados, inclusive termo de Doação de Dentes a ser utilizado para a coleta, porém, a Carta de Encaminhamento do Departamento está em desacordo com as normas estabelecidas, devendo ser retificada.

Recomendações:

Retificar o documento Carta de Encaminhamento.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A Carta de Encaminhamento/Termo de Aquiescência deverá ser corrigida conforme orientações em Protocolo de Pesquisa, no site deste CEP, em atendimento à Resolução 466/12 e submetida na Plataforma Brasil tipo EMENDA. Sendo assim o projeto de pesquisa pode ser aprovado com a recomendação de correção no documento acima citado.

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, mas se faz necessário correção no documento Carta de Encaminhamento/Termo de Aquiescência. 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, 03 de Abril de 2014

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

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Departamento de Prótese e Periodontia

EMENDA

Bauru, 22 de junho de 2016

Senhora Coordenadora Comitê de Ética em Pesquisa-FOB-USP,

Encaminhamos ao Comitê de Ética em Pesquisa a emenda do Projeto de Pesquisa "Efeitos do tratamento da superfície radicular por lasers em alta intensidade e terapia fotodinâmica na proliferação de células de granulação óssea humana" de autoria de Renato Taddei de Toledo Barros sob a orientação do(a) Profª Drª Carla A. Damante para ser avaliado do ponto de vista ético.

Pelo fato de não ter sido possível a utilização por problemas nas amostras de lasers alta potência em nosso projeto precisamos mudar o nome deste bem como pequenos detalhes em sua metodologia. O nome do novo será "Efeitos dos tratamentos mecânico, químico e fotodinâmico na proliferação de células da granulação óssea humana sobre raízes dentárias". Basicamente as alterações compreendem a retirada dos dois grupos de tratamento com lasers de alta potência e da inclusão de um grupo de tratamento químico. Segue em anexo as alterações feitas no projeto. Os termos de doação de dentes humanos extraídos a serem utilizados serão os mesmos cujo nome consta "Efeitos do tratamento da superfície radicular por lasers em alta intensidade e terapia fotodinâmica na proliferação de células de granulação óssea humana" visto que os dentes já foram coletados e a pesquisa concluída.

Orientador(a)
Profª Drª Carla A. Damante

Autor(a)
Renato Taddei de Toledo Barros

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
marcela@fob.usp.br Fone (0xx14) 3235-8366 / 3235-8278 - Fax (0xx14) 3223-4679
http://www.fob.usp.br