



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

CAMILA SAID MOREIRA

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES TRATAMENTOS FÍSICO-QUÍMICOS
NA ADESÃO E VIABILIDADE DE FIBROBLASTOS DE LIGAMENTO
PERIODONTAL À SUPERFÍCIE RADICULAR SIMULANDO DENTES
AVULSIONADOS**

2016

CAMILA SAID MOREIRA

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES TRATAMENTOS FÍSICO-QUÍMICOS NA ADESÃO
E VIABILIDADE DE FIBROBLASTOS DE LIGAMENTO PERIODONTAL À
SUPERFÍCIE RADICULAR SIMULANDO DENTES AVULSIONADOS**

Tese apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciências e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade Endodontia.

Orientador: Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo

São José dos Campos

2016

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2016.

Said Moreira, Camila

Influência de diferentes tratamentos físico-químicos na adesão e
viabilidade de fibroblastos de ligamento periodontal à superfície
radicular simulando dentes avulsionados / Camila Said Moreira. -
São José dos Campos : [s.n.], 2016.
77 f. : il.

Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em
Odontologia Restauradora - Instituto de Ciência e Tecnologia de São
José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2016.
Orientador: Carlos Henrique Ribeiro Camargo.

1. Avulsão dentária. 2. Ácido etilenodiaminotetracético. 3.
Ensaio de imunoabsorção enzimática. I. Ribeiro Camargo, Carlos
Henrique, orient. II. Instituto de Ciência e Tecnologia de São José
dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. III. Universidade
Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'. IV. UNESP - Univ
Estadual Paulista. V. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática,
ICMC/USP com adaptações - STATi e STI do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer
meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 17 de fevereiro de 2016
E-mail: camilasaid@gmail.com

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo (Orientador)

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera Garakis

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Prof. Tit. Giulio Gavini

Faculdade de Odontologia
USP – Universidade de São Paulo
Campus de São Paulo

Profa. Dra. Aletéia Massula de Melo Fernandes

Prof. Dr. Frederico Canato Martinho

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 17 de fevereiro de 2016.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Maurício Alves Moreira e Tânia Mara Said Moreira**, pelo carinho, dedicação e pelos esforços incontáveis para nos dar a melhor educação e as melhores instruções para seguirmos de forma honesta nesta caminhada chamada vida.

Ao meu marido, **Bruno Rafael Pinto**, por ser, nesses 12 anos juntos, o meu pilar, minha sustentação, meu grande companheiro, amigo e grande amor. Você faz com que minhas escolhas sejam as melhores e meu caminhar suave.

Às minhas irmãs, **Patrícia Said Moreira e Mariana Said Moreira**, por serem as melhores amigas que alguém poderia ter. Amo vocês de forma apaixonante e absurda.

À minha filha, **Maria Eduarda**, por me lembrar diariamente o que é o amor verdadeiro, doído e necessário. Você me ensinou o que é doar e se abster do que eu quero em prol da sua felicidade.

AGRADECIMENTOS

À UNESP – Univ Estadual Paulista, na pessoa do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora, na pessoa do coordenador Prof. Adj. Alexandre Luiz Souto Borges.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora.

À CAPES pela concessão de bolsa.

À equipe da Biblioteca pela ajuda nas correções e normalização deste trabalho, na pessoa da bibliotecária Renata Aparecida Couto Martins.

À Deus, por toda essa experiência chamada vida. Pelo ar que respiro, pelo alimento que tenho a mesa, pelos amigos e familiares, pelas bênçãos que recebo todos os dias. Por ter me guiado e me colocado hoje nesta Instituição. Por ter me mostrado que nossa vida se baseia em escolhas e que nem sempre as más experiências devem ser interpretadas como ruins, mas sim como aprendizados.

Ao Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo, meu orientador, pelos três anos de respeito e educação. Trabalhar com o senhor foi extremamente gratificante. O senhor sabe ouvir, acolhe nossas opiniões, nos guia quando o caminho escolhido está errado. A estrada até aqui foi suave e só poderia ter sido assim com uma pessoa calma e extremamente inteligente ao nosso lado. Obrigada por ter me aceitado tão bem.

À Profa. Titular Marcia Carneiro Valera Garakis pelo incentivo, pela dedicação em nos ensinar e pela amizade. A senhora sabe despertar a vontade de querer sempre aprender mais e mais, sabe reconhecer e elevar nossas aptidões e sabe nos guiar nos melhores caminhos. A senhora, nestes cinco anos de pós-graduação

representou, para mim, mais do que uma professora e coordenadora. A senhora estendeu sua mão e nos acolheu como filhos. Obrigada por permitir que eu tivesse esse convívio com a senhora e com os demais professores. Obrigada por me parar nas escadas do prédio das clínicas para falar sobre as inscrições para o mestrado. Obrigada por me valorizar.

À Profa. Adj. Ana Paula Martins Gomes, minha outra mãe, pela atenção, cuidado, carinho e amor que tem por mim. Acredito que depois de tanto tempo a senhora já saiba o quanto representa na minha vida. Jamais irei me esquecer de tudo o que a senhora fez por mim, de toda preocupação que a senhora tem comigo, se estou bem, se estou me alimentando bem, se durmo bem. Coisas de mãe. Obrigada por ser minha professora e minha amiga. Te levarei para sempre no coração. Espero que suas filhas encontrem uma pessoa assim na vida delas, que represente tudo o que a senhora representa para mim.

Ao Prof. Bruno das Neves Cavalcanti, por todo ensinamento, paciência e ajuda com a minha tese. Aprendi muitas coisas com o senhor e agradeço imensamente a Deus por existirem pessoas assim como você. Obrigada!

Ao Prof. Frederico Canato Martinho, pela ajuda com minha tese, pela amizade, pelos ensinamentos, pela mão sempre estendida. Obrigada por me ceder material e conselhos para meus estudos. Obrigada por querer meu melhor.

Ao Prof. Cláudio Antônio Talge Carvalho, pelo companheirismo e amizade.

Às minhas amigas de doutorado Rafaela de Andrade Vasconcelos e Maria Tereza Pedrosa de Albuquerque pelos cinco anos de amizade, pelo convívio fraterno, por toda ajuda e preocupação. Amo vocês e estarão sempre em meu coração. Ao meu amigo Rafael Binato Junqueira, também pela amizade e ótima convivência. Foi extremamente gratificante te conhecer e poder trabalhar com você.

À minha amiga de mestrado, e agora do doutorado, Monique Costa Moreira França, pela companhia, pelos bons momentos, pelos conselhos e pelas risadas. Adorei te conhecer e espero que nossa amizade perdure para sempre.

À minha amiga Gleyce Oliveira Silva, pela amizade e toda ajuda durante o doutorado. Não tenho palavras para descrever como você foi e é importante pra mim. As horas dentro do laboratório me renderam mais do que ensinamento, mas me deram uma amiga confiante e dedicada. Obrigada!

Aos demais docentes e funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, pelo ótimo convívio.

Aos funcionários da secretaria da Pós-Graduação por nos salvarem quando estamos perdidos com prazos e entregas. Obrigada.

Ao meu marido, Bruno Rafael Pinto, pela paciência, por me ajudar quando eu achei que tinha perdido tudo do meu pen-drive, por imprimir folhas e folhas quando tenho prazo apertado para entregar meus documentos. Pelo carinho, por me incentivar a estudar mais e mais, por sentir orgulho de ser quem eu sou. Por todo amor dedicado a mim, eu agradeço. Não seria nem um terço do que sou hoje se não fosse por você. Te amo muito e agradeço a Deus por sua vida.

Aos meus pais, obrigada por minha vida. Sei que posso contar sempre com vocês, sei que me apoiam nas minhas escolhas e sei que o quanto se sacrificaram para que eu e minhas irmãs tivéssemos sempre o melhor. Amo muito vocês. Obrigada por estarem sempre perto e por me mostrarem até hoje o certo e o errado.

Às minhas irmãs, Patrícia e Mariana, por existirem. Se hoje quero ter mais filhos é para que a minha pequena Duda tenha irmãs como vocês. A amizade e o amor de vocês é o que tenho de mais intenso e verdadeiro.

À minha filha, Maria Eduarda, por se comportar tão bem dentro da minha barriga. Me possibilitou avançar nos meus estudos, deixando tudo bem encaminhado para o fim. E por me chutar sempre mostrando que existe e que me ama. Me ensinou um tipo de amor que só experimenta quem é mãe e pai, e me mostrou que somos capazes de nos importar mais com a vida de outras pessoas.

Aos demais colegas da Endodontia, obrigada pelos ótimos momentos que passei com vocês, mesmo que tenham sido poucos. Foi ótimo conhecê-los e espero que a amizade permaneça.

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Citocinas inflamatórias.....	16
2.2 Tratamentos para dentes avulsionados.....	19
3 PROPOSIÇÃO.....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Preparo dos discos.....	32
4.1.1 Primeira etapa do estudo: tratamento dos discos com EDTA 17%.....	34
4.1.2 Segunda etapa do estudo: tratamento dos discos com Emdogain [®] , ácido hialurônico e colágeno.....	35
4.2 Cultivo das células.....	36
4.3 Descongelamento.....	37
4.4 Troca de meio.....	37
4.5 Subcultura.....	37
4.6 Contagem das células.....	38
4.7 Plaqueamento.....	39
4.8 Ensaio XTT.....	40
4.9 Preparo dos discos para M.E.V.....	41
4.10 Quantificação de citocinas pelo teste de ELISA (ELISA – <i>Enzymelinked immunosorbentassay</i>).....	41
4.11 Análise estatística.....	44

5	RESULTADOS.....	45
5.1	Primeira etapa do estudo (aplicação de EDTA 17% variando-se o tempo de aplicação e o fator agitação).....	46
5.1.1	Estatística descritiva para a 1ª etapa do estudo.....	46
5.1.2	ANOVA e Teste de Tukey para a 1ª etapa do estudo.....	48
5.1.3	Microscopia eletrônica de varredura (M.E.V.).....	49
5.2	Estatística descritiva para a 2ª etapa do estudo.....	50
5.2.1	Kruskal-Wallis e Teste de Dunn.....	51
5.3	ELISA.....	53
5.3.1	ANOVA e Tukey.....	56
6	DISCUSSÃO.....	58
6.1	Estimulação biológica e adesão celular.....	59
6.2	Influência dos tratamentos físico-químicos na expressão de citocinas.....	64
7	CONCLUSÃO.....	67
8	REFERÊNCIAS.....	68
	APÊNDICE.....	75
	ANEXO.....	76

Said Moreira C. Influência de diferentes tratamentos físico-químicos na adesão de fibroblastos de ligamento periodontal à superfície radicular simulando dentes avulsionados [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP- Univ Estadual Paulista, 2016.

RESUMO

O reimplante tardio de dentes avulsionados é uma realidade dentro dos consultórios odontológicos. Na tentativa de se restabelecer a arquitetura e a função do ligamento periodontal, além de se evitar a anquilose, evitando ou modulando a reabsorção por substituição, a superfície radicular dos dentes avulsionados pode ser tratada com diversas substâncias, dentre elas o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) a 17%, sempre visando uma menor chance de ocorrer reabsorção inflamatória e por substituição. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do tratamento de discos da superfície vestibular de raízes de dentes bovinos, com EDTA 17%, com Emdogain[®], com ácido hialurônico e com colágeno, através de testes de viabilidade celular, quantificação das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α por ensaio ELISA, além da ilustração por microscopia eletrônica de varredura da adesão dos fibroblastos sobre os discos de dentina. Foram cortados 155 discos de dentina, com 4,5 mm de diâmetro, da face vestibular da superfície radicular de dentes bovinos, previamente raspados ou não com cureta periodontal. Os discos foram regularizados, limpos e autoclavados. Os espécimes foram tratados com as substâncias preconizadas e colocados em placas de 96 poços onde foram semeadas células de culturas primárias de fibroblastos humanos de ligamento periodontal, que ficaram em contato com os discos por 48 horas. A sobrevivência e a viabilidade celular na superfície dos discos foram avaliadas através do ensaio de XTT. A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para verificar a adesão de fibroblastos à superfície dos discos. A detecção e quantificação das citocinas foram realizadas pelo teste ELISA. Os dados foram submetidos à análise estatística pelo teste ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). Os resultados obtidos mostraram que o uso de EDTA 17% por 5 minutos sem agitação foi mais eficaz que os outros protocolos ($p < 0,05$) e aliado ao ácido hialurônico, foi menos citotóxico promovendo melhor viabilidade celular. Não foi possível assegurar a visualização dos fibroblastos em microscopia eletrônica de varredura. Quanto ao ensaio de ELISA, houve expressão das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-8 (citocinas pró-inflamatórias), porém houve diferença estatisticamente significativa entre a IL-6 e a IL-8. Sendo assim, podemos concluir que o EDTA 17% por 5 minutos sem agitação e o ácido hialurônico apresentaram menor índice de citotoxicidade aos fibroblastos do ligamento periodontal, porém houve resposta inflamatória pela expressão de IL-6 e IL-8.

Palavras-chave: Avulsão dentária. Ácido etilenodiaminotetracético. Ensaio de imunoadsorção enzimática.

Said Moreira C. Influence of different physical-chemical treatment on periodontal ligament fibroblast adhesion to root surface of simulated avulsed teeth [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2016.

ABSTRACT

The delayed reimplantation of avulsed teeth is a reality in dental offices. In an attempt to restore architecture and function of the periodontal ligament, avoiding ankylosis, preventing or modulating the replacement resorption, avulsed teeth root surface may be treated with various substances including EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) to 17%, always seeking a lower chance of occurring inflammatory or replacement resorption. Thus, the aim of this study was to evaluate the effectiveness of the treatment of discs cutted of the vestibular surface of bovine teeth roots with EDTA 17% with Emdogain® with hyaluronic acid and collagen through cell viability tests, quantification of cytokines IL -1 β , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α by ELISA assay and, in addition, it was taken Illustrations by scanning electron microscopy of the accession of fibroblasts on the dentin disks. 155 dentin discs with 4,5 mm in diameter will be cut from the vestibular surface of the root surface of bovine teeth, previously scraped or not with periodontal curette. The discs were regularized, cleaned and autoclaved. The specimens were treated with the substances advocated and placed in 96 well plates are seeded in which primary cell cultures of human periodontal ligament fibroblasts that were in contact with the discs for 48 hours. The survival and cell viability on the surface of the disks are evaluated by XTT assay. The scanning electron microscopy was used to verify adherence of fibroblasts to the surface of the discs. Detection and quantification of cytokines were done by ELISA assay. The data were statistically analyzed by ANOVA and Tukey ($p < 0.05$). The results showed that the use of 17% EDTA for 5 minutes without stirring was more effective than the other protocols ($p < 0.05$) and combined with hyaluronic acid was less cytotoxic promoting better cell viability. It was not possible to ensure the fibroblasts display in scanning electron microscopy. As for the ELISA assay, there was expression of IL- 1 β , IL -6 and IL -8 (pro- inflammatory cytokines), but there was just statistically significant difference between IL -6 and IL -8. Thus, we can conclude that 17% EDTA for 5 minutes without stirring and hyaluronic acid showed less cytotoxicity index fibroblasts of the periodontal ligament, but there was inflammatory response by IL -6 and IL-8 expression .

Keywords: Tooth avulsion. Edetic acid. Enzyme-linked immunosorbent assay.

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a prevalência e a incidência de injúrias dentais traumáticas têm sido muito estudadas, e a maior prevalência no Brasil tem sido observada em estudantes na faixa etária abaixo de 12 anos de idade (Damé-Teixeira et al., 2013). Dentre estas injúrias, a avulsão é um dos mais graves traumatismos e de prognóstico muito dependente de inúmeros fatores. Há muitas décadas tem se tentado estabelecer protocolos para o tratamento de pacientes com dentes avulsionados (Andersson et al., 2012), porém observa-se uma lenta evolução nas pesquisas básicas nesta área.

A avulsão implica o deslocamento total do dente de seu alvéolo devido à ruptura do ligamento periodontal que deixa células viáveis na maior parte da superfície da raiz do dente (Lopes, Siqueira Jr, 2010). Se o dente avulsionado permanecer por pouco tempo no meio extra-alveolar, as chances dessas células se repararem após o reimplante imediato são altas, e a destruição causada pela reação inflamatória será mínima. O reimplante imediato permite que os remanescentes do ligamento periodontal, junto com a corrente sanguínea, possam se reorganizar como um tecido de granulação que pode se regenerar sob condições ideais (Gulinelli et al., 2008). Portanto, o tratamento ideal da avulsão de um dente permanente é a sua reimplantação imediata no alvéolo, já que o sucesso da regeneração do ligamento periodontal depende de fatores como o meio de armazenamento do dente e o tempo extra-alveolar antes do reimplante (Poi et al., 2007), além da correta fixação e ajuste oclusal.

Por outro lado, sabe-se que o ressecamento em excesso da superfície radicular irá causar danos às células do ligamento periodontal, ocorrendo uma resposta inflamatória difusa (Trope et al., 2011), que poderá gerar uma substituição do cemento e dentina por osso, denominada reabsorção por substituição (Lopes, Siqueira Jr, 2009). Em um primeiro momento, áreas de necrose, acúmulo de sangue e um exsudato inflamatório se formam entre as fibras do ligamento periodontal e no espaço ocupado por ele (Saito et al., 2011). O movimento lento dos cementoblastos não permite o recobrimento total da

superfície radicular a tempo e as células ósseas irão se aderir a estas áreas promovendo anquilose e, possivelmente, pode se iniciar uma reabsorção substitutiva pelo processo da remodelação óssea (Trope et al., 2011). Além disso, as células do ligamento periodontal podem sofrer necrose e, nestes casos, o tecido de granulação pode ser substituído por tecido ósseo e iniciar o processo de reabsorção, que na presença de microrganismos pode se tornar uma reação inflamatória (Gulinelli et al., 2008).

Todavia, o reimplante tardio é uma realidade clínica para os dentistas, considerando o momento que o paciente chega ao consultório odontológico, sua idade, fatores locais, de saúde geral e das condições do armazenamento do dente (Poi et al., 2007). Quando o tempo extra-oral do dente avulsionado é maior que 15 a 20 minutos sem umidade e por mais de 4 horas em leite, as células do ligamento periodontal provavelmente não estarão mais viáveis e a raiz deve ser tratada para minimizar as prováveis consequências deste ressecamento (Trope et al., 2011). Para limitar ou prevenir a reabsorção radicular e promover o reparo dos tecidos, um dente submetido a um reimplante tardio deve receber um tratamento na superfície radicular e início da terapia endodôntica (Mori et al., 2013).

Algumas questões têm sido levantadas a respeito das terapias que regulam ou promovem a proliferação e diferenciação das células do ligamento periodontal, como o uso de fatores de crescimento, moléculas de adesão à superfície e/ou componentes da matriz extracelular e se estes são capazes de melhorar o prognóstico do dente avulsionado (Hoang et al., 2002).

Uma das substâncias de amplo espectro de utilização na terapia endodôntica é o sal dissódico de EDTA devido à sua ação quelante com propriedades lubrificantes (Çalt, Serper, 2002). Devido à essas propriedades, além da molhabilidade sobre superfícies, o EDTA 17% vem sendo estudado como promotor da adesão celular sobre superfícies de raízes dentárias simulando processo de avulsão com reimplante tardio (Pang et al., 2014).

Dentro deste contexto, também tem sido utilizado o fluoreto de sódio para o tratamento da superfície e a matriz derivada de esmalte, ou Emdogain[®], o primeiro com o objetivo de tornar a dentina mais resistente à ação dos osteoclastos e retardar a reabsorção por substituição, o segundo com o propósito de estimular a regeneração biológica através da migração, proliferação e

diferenciação dos fibroblastos do ligamento periodontal (Poi et al., 2007; Trope et al., 2011). Além dessas substâncias, também foram estudadas a aplicação de vitamina C (Panzarini et al., 2005), solução de nitrato de gálio, uma substância anti-reabsortiva (Mori et al., 2007), o própolis 15% (Gulinelli et al., 2008), a aplicação de hidróxido de cálcio misturado a CMCP (Cânfora p-Monoclorofenol) ou clorexidina (Trevisan et al., 2011), o uso de terapia a laser de baixo intensidade (He et al., 2009; Saito et al., 2011), tratamento com laser de diodo (Carvalho et al., 2012) e a aplicação de pasta de acetazolamida (Mori et al., 2013).

Nos anos atuais, as pesquisas têm se voltado para a regeneração e reabilitação dos tecidos que sofreram alguma injúria e que possuem baixo potencial de recuperação com sequelas previsíveis. Na engenharia de biomateriais, e hoje nos demais setores da saúde, os *scaffolds* têm tido grande aplicabilidade por possuir similaridade com o organismo, além de prover ao mesmo, condições de restabelecimento. A aplicação de colágeno, ácido hialurônico e matriz derivada do esmalte (Emdogain[®]) têm sido estudadas na tentativa de se obter as condições ideais para o reestabelecimento do ligamento periodontal (Lyngstadaas et al., 2001; Bansal et al., 2010; Rungsiyanont et al., 2012; Yang et al., 2012) e, pelo modo como geram um arcabouço para a adesão das células podem ser considerados *scaffolds*.

Além dos biomateriais e *scaffolds*, o processo inflamatório que acontece quando do reimplante do dente previamente tratado também tem gerado questionamentos, a cerca de quais mediadores químicos inflamatórios são liberados e qual o papel dos mesmos na resposta inflamatória. A interleucina 1 β , citocina proinflamatória expressa pelos fibroblastos do ligamento periodontal, é capaz de mediar o processo de defesa do hospedeiro, como por exemplo, a resposta inflamatória e celular a uma injúria. Já o fator de necrose tumoral- α é capaz de, coordenadamente, estimular a indução de IL-1 β e diminuir os efeitos da mesma (Lin et al., 2015). Dentre outras citocinas, a interleucina 6 mantém a homeostase tecidual, é capaz de mediar a resposta aguda, além de ser um fator de crescimento hematopoiético, induz a diferenciação neuronal das células e contribui com a remodelação óssea (Lyngstadaas et al., 2001). Já a interleucina 8 é produzida por macrófagos e células mesenquimais, sendo uma citocina muito

importante na resposta inflamatória devido à sua ação quimiotática para neutrófilos, mediando a resposta inflamatória, e atuação como fator angiogênico. (Nasser et al., 2009; Cviki et al., 2015). Por fim, a interleucina 10 tem propriedades supressoras e anti-inflamatórias que são capazes de inibir a transcrição de citocinas pró-inflamatórias (Baek et al., 2013).

O processo de cura dos tecidos ao redor de um dente reimplantado tardiamente pode ser avaliado através de análise histomorfométrica e imunohistoquímica, que são dois tipos de instrumentos que se complementam na busca pela informação precisa de expressão e localização de cada proteína envolvida na cura (Saito et al., 2011; Carvalho et al., 2012). Além disso, tem-se utilizado a investigação por microscopia para análise da superfície radicular após o tratamento da mesma com substâncias que evitem a reabsorção e estimulem o reparo (Mori et al., 2007) e a análise histológica (Wang et al., 2010; Trevisan et al., 2011; Zhou et al., 2012). Porém, dentre os diferentes métodos de estudo encontrados na literatura, pode-se empregar também o uso de ensaios para avaliação da sobrevivência e viabilidade celular, testes de expressão gênica (Palaiologou et al., 2001) e microscopia eletrônica de varredura para verificar a adesão de fibroblastos à superfície radicular de dentes reimplantados tardiamente.

Sendo assim, devido às variações nos tratamentos da superfície radicular de dentes avulsionados e reimplantados tardiamente, com este estudo pretende-se avaliar a eficácia de diferentes protocolos físico-químicos na adesão e viabilidade de fibroblastos à superfície radicular através de teste de XTT e ilustração por MEV, e a quantificação das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α pelo ensaio ELISA. A hipótese do estudo é a de que o tratamento da superfície radicular com EDTA 17% e os diferentes materiais testados aumentem a viabilidade celular dos fibroblastos do ligamento periodontal, permitindo a regeneração do mesmo e verificar qual destas substâncias promovem uma resposta inflamatória de menor intensidade.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Citocinas inflamatórias

Baek et al. (2013) em seu estudo, objetivou avaliar a expressão de genes associados à inflamação, degradação da matriz extracelular e destruição óssea em fibroblastos gengivais obtidos de tecidos saudáveis e com periodontite na presença ou não de *P.gingivalis*. Para a pesquisa, foram isolados fibroblastos gengivais primários de pacientes saudáveis (n = 10) e de pacientes com periodontite (n = 10) que foram estimulados *in vitro* juntamente com cepas de *P.gingivalis* ATCC 49417. Para a expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8 e IL-1 β e citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10, além de MMP-1, MMP-2, TIMP-3 e osteoprotegerina (OPG) foi utilizado o ensaio de PCR em tempo real. Os níveis de IL-6, IL-1 β e proteína TIMP-3 foram medidos através de ensaio de ELISA. Portanto, os autores observaram que a expressão de IL-6, IL-1 β e TIMP-3 foram altas nos grupos com periodontite quando comparado ao grupo de pacientes saudáveis, enquanto que a IL-4 foi mais expressa no grupo saudável na presença ou ausência de cepas de *P. gingivalis*. Os níveis expressos de IL-6, IL-1 β e TIMP-3 também foram altos no grupo de pacientes com periodontite na presença ou ausência de cepas de *P. gingivalis*. Os autores também observaram que havia variabilidade entre as cepas de *P. gingivalis* na habilidade de induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, MMPs e OPG e na habilidade de degradar a proteína IL-6. Sendo assim, uma alta expressão de citocinas pró-inflamatórias e TIMP-3 e baixa expressão de IL-4 estão relacionadas aos fibroblastos gengivais e periodontite.

Belibasakis et al. (2013) tiveram por objetivo avaliar, *in vitro*, o efeito do complexo vermelho como constituinte do biofilme subgengival na regulação da IL-8 no epitélio gengival. Para a pesquisa, foram selecionados os microrganismos *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Veillonella dispar*, *Actinomyces oris*, *Streptococcus anginosus* e *Streptococcus oralis* e outras 7 espécies que não fazem parte do complexo vermelho (controle) Os biofilmes

criaram em placas de 24 poços sobre discos sintéticos de hidroxiapatita simulando superfície radicular. Para os testes de cultura celular e citotoxicidade foram utilizadas células epiteliais da gengiva estratificada que foram expostas aos biofilmes. Além disso, foi realizado o teste de qPCR para expressão gênica e ensaio de ELISA para avaliação da expressão de IL-8. Após 3 horas, os biofilmes revelaram expressão da IL-8, porém, a presença do complexo vermelho resultou em uma maior expressão. Portanto, os autores concluíram que o complexo vermelho é capaz de regular a expressão de IL-8 no epitélio gengival, potencialmente afetando a resposta quimiotática dos tecidos.

Outro estudo avaliando o crescimento celular e a expressão de citocinas pró-inflamatórias é o de Diomedea et al. (2014). Para a pesquisa, os autores utilizaram um cimento à base de metacrilato (UDMA), o EndoRez sobre células de polpa dental humana (hDPSCs), células de ligamento periodontal humano (hPDLSCs), fibroblastos gengivais humanos (hGFs) e osteoblastos humanos (hOSTs). As células, obtidas de cinco doadores jovens, foram isoladas *in vitro* e semeadas em placas de 96 poços juntamente com meio de cultura em diferentes períodos de tempo: 24, 48, 72 horas e 1 semana. As células semeadas sobre o cimento foram avaliadas pelo teste MTT para conferência da viabilidade celular. O teste de tripan azul foi realizado também para verificação da viabilidade celular e proliferação nos mesmos períodos de tempo, em microscópio de luz invertida. Para a microscopia eletrônica de varredura os espécimes foram fixados e desidratados, e depois fixados em stubs para metalização e visualização. Para o ensaio de ELISA, o sobrenadante das células cultivadas sobre o cimento foi coletado e foram feitas as análises para IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- α . Após todos os testes os autores observaram que a exposição das células ao cimento à base de UDMA resultou em decréscimo em 50% das células viáveis após 24 horas de incubação. Não foi possível visualizar nenhuma mudança na morfologia das células cultivadas. Após 48 horas, 72 horas e 1 semana de tempo em cultura, um crescimento das células foi evidente. Uma significativa regulação das citocinas estudadas em contato com o cimento comparado ao grupo controle foi observada. Sendo assim, os autores concluíram que o cimento EndoRez foi capaz de afetar o sistema biológico evidenciado pela inibição do crescimento celular e auto-regulação das citocinas pró-inflamatórias.

Shibata et al. (2014) investigaram os efeitos da IL-17 sobre a produção de IL-6, IL-1 β e matriz metaloproteinase (MMP-1) e comparar a produção de MMP-1 entre os efeitos individuais e combinados da IL-6 e IL-1 β sobre fibroblastos do ligamento periodontal humano (HPDLF). Essas células foram cultivadas e transferidas para placas até que as mesmas atingissem 70% de confluência. A seguir, as células foram estimuladas com IL-17 por meia hora, 1, 4, 24, 48 e 72 horas e foram cultivadas com IL-1 β , IL-6/Sil-6R, ou uma combinação de IL-1 β e IL-6/sIL-6R por 24 horas. Para o PCR em tempo real, o RNA foi isolado das células HPDLF e foram utilizados primers específicos para a IL-1 β , IL-6 e MMP-1. Para o ensaio de ELISA, o sobrenadante foi coletado para análise dos níveis de IL-1 β , IL-6 e MMP-1. Os autores observaram que a IL-17 aumentou significativamente a expressão de IL-6 e MMP-1 e transitoriamente aumentou a expressão do gene para IL-1 β . Além disso, observaram que a combinação de IL-1 β e IL-6/sIL-6R aumentou os níveis de MMP-1 quando comparada com a atuação isolada da IL-1 β . Portanto, os autores concluíram que a IL-17 regula a produção de IL-6 e MMP-1 em células HPDLF. O estudo sugeriu que a IL-17 induz a produção de MMP-1 não só diretamente, mas também indiretamente pela promoção da produção de IL-6, resultando na degradação de colágeno no ligamento periodontal.

Um estudo mais recente de Civkl et al. (2015) avaliou a hipótese de que saliva estéril e filtrada seria capaz de desenvolver um processo inflamatório em células orais, *in vitro*. Para a pesquisa foram selecionados fibroblastos da gengiva, palato e ligamento periodontal e células epiteliais primárias. As células foram isoladas e cultivadas, para a seguir, serem colocadas em contato com uma diluição de saliva estéril e filtrada, incubadas por 6 horas para análises de expressão e 24 horas para os ensaios de imuno. A expressão de citocinas e quimiocinas foi analisada por ensaio micro, RT-PCR, imunoensaio e tecnologia Luminex. O envolvimento das vias de sinalização foi determinado por Western blot e inibidores farmacológicos. Os autores já haviam reportado que a saliva é capaz de induzir a expressão de IL-6 e IL-8 em fibroblastos da gengiva, palato e ligamento periodontal, porém não em células epiteliais. Esta resposta inflamatória exige a sinalização do fator kappa-B nuclear e proteína quinase ativada por mitogéno. A tecnologia Luminex revelou que a saliva aumenta substancialmente a

expressão de vários outros genes inflamatórios e várias quimiocinas. Portanto, os autores concluíram que a saliva é capaz de provocar uma resposta inflamatória em fibroblastos orais.

Liu et al. (2015), avaliou o ciclo inflamatório e produção de citocinas pelos fibroblastos do ligamento periodontal (PDLF) em contato com *Porphyromonas gingivalis*. No estudo, as células foram extraídas de tecido do ligamento periodontal e cultivadas em meio próprio. A seguir, elas foram semeadas em placas de 6 poços e incubadas até atingir a confluência do poço. A diluição bacteriana foi colocada em contato com as células. Para a detecção da viabilidade celular foi realizado o teste de MTT e para análise do ciclo celular foi utilizado um citometro. Também foram realizados testes de PCR em tempo real, Western blot e detecção de citocinas pelo ensaio de ELISA (IL-6 e IL-8). Com os resultados, os autores concluíram que a infecção por *P. gingivalis* pode modular a expressão de genes dos fibroblastos do ligamento periodontal que controlam o ciclo celular e a produção de citocinas inflamatórias, já que houve um aumento na expressão de IL-6 e IL-8, contribuindo na inflamação do tecido periodontal.

2.2 Tratamentos para dentes avulsionados

Em 2001, Lyngstadaas et al. investigaram os mecanismos celulares, fatores de crescimento autócrinos, a síntese de matriz extracelular e o crescimento celular na regeneração de fibroblastos do ligamento periodontal expostos à matriz extracelular derivada do esmalte. Na realização do estudo, células humanas do ligamento periodontal (RN6) foram obtidas de periodonto saudável de pré-molares extraídos por motivos ortodônticos. Essas células foram isoladas e cultivadas em meio DMEM. Foram utilizadas também células epiteliais (HeLa) cultivadas em meio Eagle MEM. A seguir, as células foram colocadas em contato com diluição de matriz extracelular derivada de esmalte (Emdogain[®]-EMD). Para avaliação da adesão celular, as células que não se aderiram às placas Sarstedt foram lavadas e centrifugadas para posterior contagem (controle). As células aderidas foram removidas da superfície através de tripsinização e contadas da mesma forma que o grupo controle. Para análise de densidade, as

células foram semeadas e mantidas em cultura com e sem EMD por 24, 48, 72, 96 ou 120 horas para posterior contagem em microscópio. Já o metabolismo celular foi avaliado através de cultura por 24, 48, 72, 96, 120 ou 144 horas. Além disso, foram realizados os testes para síntese de ácido nucleico, detecção de AMP-cíclico e detecção de fatores de crescimento (TGF- β 1, IL-1 α , IL- β , IL-2 e IL-6, e PDGF). Os autores observaram que a taxa de adesão, crescimento e metabolismo das células do ligamento periodontal aumentou frente à aplicação de EMD. Notaram também que o AMPc intracelular teve sua sinalização aumentada e a produção de TGF-1 β , IL-6 e PDGF AB também aumentou em comparação ao grupo controle. Já para as células epiteliais, houve aumento no AMPC e secreção de PDGF AB quando em contato com o EMD, porém a proliferação e crescimento foram inibidos. Sendo assim, os autores concluíram que o EMD aumentou a taxa de adesão, crescimento e metabolismo das células do ligamento periodontal e, conseqüentemente, liberou grande quantidade de fatores de crescimento no meio. Em contrapartida, as células epiteliais apresentaram inibição do crescimento. Portanto, sugere-se que o EMD favorece o crescimento de células mesenquimais e os fatores de crescimento autócrinos liberados pelas células do ligamento periodontal expostas ao EMD contribuem para a regeneração e cura em um processo que mimetiza o desenvolvimento natural da raiz dentária.

O objetivo do estudo de Palailogou et al. 2001 foi investigar as possíveis diferenças nas propriedades de adesão e expressão de fibronectina, laminina, vitronectina, RGD peptídeo, colágeno tipo I e colágeno tipo IV sobre fibroblastos da gengiva, da derme, e do ligamento periodontal através de avaliação fluorométrica e a RT-PCR. Primeiramente foi feita uma cultura do tecido gengival e da derme para obtenção dos fibroblastos e também os fibroblastos de ligamento periodontal humano. Além disso, as proteínas da matriz extracelular obtidas comercialmente (fibronectina, vitronectina, laminina, colágeno tipo I e colágeno tipo IV) foram diluídas e examinou-se a adesão das células a um polímero RGD-peptídico. A seguir, o RNA foi isolado e através da ação da enzima transcriptase reversa foi-se obtido o DNA complementar que pode ser aplicado à reação da cadeia de polimerase utilizando primers específicos para 19 subunidades das integrinas. Os autores observaram que os fibroblastos da gengiva e do ligamento periodontal aderiram à vitronectina e aos colágenos tipos I e IV mais avidamente

que os fibroblastos da derme. Da mesma forma, os fibroblastos do ligamento periodontal aderiram bem à laminina. A quantificação de expressão de integrinas mostrou que os diferentes tipos de fibroblastos expressaram diferentes fatores de transcrição de integrina demonstrando ainda mais suas diferenças inatas. Sendo assim, os três tipos de fibroblastos estudados mostraram comportamentos diferentes e expressaram diferentes receptores da matriz extracelular. Ao mesmo tempo, os fibroblastos da gengiva e do ligamento periodontal apresentaram similaridade na adesão e na expressão de integrinas.

Com o objetivo de avaliar microscopicamente os efeitos de três substâncias sobre dentes reimplantados tardiamente, Panzarini et al. (2005) utilizou incisivos centrais extraídos de ratos. Os canais radiculares foram irrigados com hipoclorito de sódio 1%. Nos grupos I, II e III os dentes foram tratados, respectivamente, com fluoreto de sódio 2% por 10 minutos, vitamina C manipulada por 10 minutos e vitamina C efervescente por 10 minutos. Os dentes foram preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio e reimplantados após a irrigação salina do alvéolo. Os ratos foram sacrificados após 10 e 60 dias e os espécimes foram enviados para processamento histológico (obtenção de secções e coloração das mesmas através de hematoxilina e eosina). No grupo I, tratado com fluoreto de sódio, apresentou as maiores áreas de reabsorção por substituição e anquilose. Comparando a ação da vitamina C nos grupos II e III, no grupo III os autores obtiveram melhores resultados mostrando mais áreas de anquilose e reabsorção por substituição do que áreas de reabsorção inflamatória.

A seguir, em 2007, Mori et al. investigaram os efeitos da solução de nitrato de gálio (uma substância anti-reabsorção) em superfície de dentes de ratos submetidos à reimplante tardio, com o objetivo de se evitar a reabsorção radicular e acelerar o processo de cura. Para esse propósito, 20 incisivos centrais superiores do lado direito foram divididos em 2 grupos: G1 – as raízes foram tratadas com solução de nitrato de gálio a $10^{-4}M$ por 20 minutos enquanto que no G2 as raízes foram tratadas com fluoreto de sódio a 2% por 20 minutos. Todos os canais foram preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio e reimplantados em seus respectivos alvéolos. Cinco animais de cada grupo foram sacrificados após 15 e 60 dias do reimplante e os espécimes foram retirados, fixados, processados e embebidos em parafina para obtenção de fatias dos terços cervical, médio e

apical, totalizando 20 fatias por espécime. As fatias foram analisadas em microscópio de transmissão de luz. Em ambos os grupos, foi observado uma pequena ocorrência de anquilose e reabsorção radicular. O tecido conjuntivo formado no ligamento periodontal estava arranjado paralelamente à raiz na maioria dos espécimes em ambos os grupos e apresentavam sinal de inflamação. No grupo 1, havia a formação de bolsa periodontal em todos os espécimes após 60 dias do reimplante, revelando falta de reparação. Os achados destes autores contradizem o uso de nitrato de gálio para o tratamento da superfície radicular de dentes que serão submetidos ao reimplante tardio.

Com o objetivo de se estabelecer parâmetros para o uso de dentes bovinos ao invés de dentes humanos em pesquisas científicas, Camargo et al. (2007) selecionaram 24 premolares unirradiculares extraídos por razões periodontais ou ortodônticas e os dividiram em grupos de acordo com a idade: GH1 – 10 a 15 anos; GH2 – 16 a 30 anos; GH3 – 31 a 45 anos e GH4 – 46 a 80 anos. A seguir, foram selecionados 24 dentes bovinos (animais com a mesma idade de vida) separados em quatro grupos: GB1 – incisivo central; GB2 – primeiro incisivo lateral; GB3 – segundo incisivo lateral e GB4 – terceiro incisivo lateral. Os espécimes foram limpos e polidos, seccionados ao nível da junção cimento-esmalte, a polpa radicular foi removida e foi realizado o desbridamento e preparo endodôntico para prover uma melhor análise dos túbulos dentinários. Os dentes foram então cortados longitudinalmente no sentido vestibulo-lingual, limpos com ultrassom por 5 minutos e lavados com EDTA por 3 minutos. Após a secagem os espécimes foram montados em stubs e analisados em microscopia eletrônica de varredura (1000x e 5000x). Pode-se observar que o terço cervical das raízes apresentou o maior número de túbulos e maior diâmetro dos mesmos quando comparado aos outros terços. Quanto ao número de túbulos dentinários, foi observado que os dentes bovinos apresentaram uma maior média quando comparado aos dentes humanos, porém essa diferença não foi observada quando o diâmetro dos dois tipos dentários foi observado.

Poi et al. (2007) avaliaram por histologia e análise histométrica a influência do Emdogain® e do fluoreto de sódio sobre a superfície radicular no processo de cura após o reimplante dentário tardio em ratos. Para o estudo, 24 incisivos de ratos foram extraídos e divididos em dois grupos: G1 – as superfícies

radiculares foram tratadas com 50 mL de hipoclorito de sódio 1% por 10 minutos, lavadas com solução salina e imersas em solução de fluoreto de sódio acidulado a 2%. Os canais foram preenchidos com hidróxido de cálcio e propilenoglicol e os dentes foram reimplantados em seus alvéolos, que não foram tratados, com exceção da remoção de coágulos de sangue. No G2 – as raízes também foram tratadas como o grupo anterior, porém a imersão dos dentes foi em gel de Emdogain[®] e a seguir foram reimplantados. Os ratos foram sacrificados após 10 e 60 dias (6 ratos de cada grupo para cada período). Os dentes foram removidos, fixados e embebidos em parafina. A seguir foram cortados e corados com hematoxilina e eosina para análise histológica e histométrica. Os resultados obtidos pelos autores mostraram que o uso de fluoreto de sódio 2% causou mais áreas de reabsorção por substituição enquanto que o uso de Emdogain[®] resultou em mais áreas anquilosadas e não foi capaz de evitar a anquilose dentoalveolar. Os autores concluíram que nenhuma das duas substâncias foi capaz de evitar a reabsorção radicular em superfícies radiculares de dentes que foram reimplantados tardiamente.

Também na tentativa de se melhorar as condições das raízes de dentes reimplantados tardiamente, Gulinelli et al. (2008), selecionou 30 ratos que tiveram os incisivos superiores do lado direito extraídos e mantidos secos e em temperatura ambiente por 60 minutos. Os canais tiveram a polpa radicular extirpada e foram irrigados com solução salina. A seguir as superfícies radiculares dos espécimes foram gentilmente raspadas com uma cureta para remover remanescentes de ligamento periodontal (PDL). A seguir os espécimes foram distribuídos em 3 grupos (n = 10) de acordo com o tratamento da superfície radicular: GI – imersão em 20 mL de solução salina por 10 minutos, GII – imersão em 20 mL de fluoreto de sódio 2% por 20 minutos e GIII – imersão em 20 mL de solução de própolis e propilenoglicol por 10 minutos. Após os tratamentos os canais radiculares foram preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio e propilenoglicol e os espécimens foram reimplantados. 60 dias após os ratos foram sacrificados e as peças anatômicas foram removidas. Os dentes foram decalcificados, embebidos em parafina, seccionados e coloração por hematoxilina-eosina. Os resultados obtidos mostraram que houve reabsorção radicular externa similar nos grupos II e III. Os dentes tratados com solução salina

fisiológica tenderam a apresentar mais casos de reabsorção inflamatória dos que os demais grupos.

Wang et al. (2010) examinaram os efeitos do autotransplante tardio em combinação com a engenharia tecidual periodontal usando células de ligamento periodontal na cicatrização do tecido periodontal já que a regeneração do mesmo em casos de dentes avulsionados que permanecem em ambiente extra-oral por tempo excessivo tem sido uma constante pesquisa por parte dos cirurgiões-dentistas. Sendo assim, foram utilizados pré-molares de cães extraídos e mantidos em ambiente seco por 1 mês após o isolamento e proliferação de células do ligamento periodontal (PDL cells). As raízes dos dentes foram divididas em dois grupos: revestidas com hidrogel de alginato contendo 1×10^6 PDL cells ou então somente o hidrogel, e autotransplantadas para alvéolos artificiais criados na mandíbula. Os cães foram sacrificados 2 meses após o transplante. Para a análise histológica, segmentos da mandíbula contendo a raiz autotransplantada foram ressecadas e imersas em formalina a 10% por 3 dias. Os espécimes foram descalcificados em solução de EDTA a 14% e embebida em parafina após a desidratação em sequência de álcoois. As secções foram obtidas de cortes no sentido perpendicular ao longo eixo das raízes e levadas ao microscópio óptico para verificar a formação de arquitetura periodontal. Os autores observaram a formação do complexo raiz-ligamento-osso em todos os casos carregados com células do ligamento periodontal. Notaram também que o tecido conjuntivo similar ao tecido periodontal formado estava localizado entre o osso alveolar e as raízes transplantadas, com fibras inseridas no novo cimento e no osso alveolar. No grupo controle, não foi encontrado tecido periodontal e foi observado casos de anquilose. Sendo assim, os autores concluíram que os resultados indicaram que células do ligamento periodontal de cultura autóloga contribuíram com o reestabelecimento da arquitetura periodontal dos dentes autotransplantados que é desprovido de células periodontais viáveis.

Em 2011, Trevisan et al. avaliaram o processo reparador da superfície radicular após o reimplante tardio de dentes avulsionados. Para a pesquisa, 30 ratos foram sedados e anestesiados para a extração dos incisivos superiores direitos. Os dentes foram segurados pela coroa, fixados em uma placa e mantidos secos por 60 minutos. A superfície radicular foi gentilmente raspada com uma

cureta para a remoção de remanescentes do ligamento periodontal e o conteúdo do canal radicular foi removido com lima Hedström 35 sob irrigação com solução salina. Após a remoção do ligamento periodontal os dentes foram imersos em 20 mL de fluoreto de sódio fosfatado acidulado 2% por 10 minutos e secos. Os dentes foram divididos em grupos de acordo com o material de preenchimento do canal radicular: G1- pasta de hidróxido de cálcio e soro, G2- pasta de hidróxido de cálcio, CMPC e uma gota de glicerina e G3- pasta de hidróxido de cálcio e clorexidina 2%. Os alvéolos foram lavados com solução salina e os dentes foram reimplantados. Seis dias após, os ratos foram sacrificados, as peças anatômicas foram removidas e fixadas em formalina 10% por 24 horas e descalcificadas em uma solução de EDTA 4,13%. A seguir, os espécimes foram embebidos em parafina e cortes foram obtidos para posterior coloração com hematoxilina e eosina, para análise histológica (onde foram observadas as características da mucosa gengival, ligamento periodontal, osso alveolar, cimento, dentina, presença de reabsorção inflamatória, reabsorção por substituição e anquilose). Para a análise histomorfométrica e medição da área afetada pelo processo de reabsorção foram utilizadas imagens do terço médio das raízes. No estudo foram observadas nas imagens histológicas, a presença de reabsorção inflamatória, reabsorção por substituição e anquilose nos 3 grupos. Houve diferença estatisticamente significativa entre o G3 e os demais grupos. O uso de hidróxido de cálcio associado a CMPC ou clorexidina não foi mais vantajoso quando comparado com o hidróxido de cálcio associado ao soro na prevenção ou controle de reabsorção inflamatória em reimplantes tardios em ratos.

Em um estudo recente de 2012, Padial-Molina et al. observaram a regulação da periostina, proteína adaptativa altamente expressa por fibroblastos do ligamento periodontal, durante o processo inflamatório. Devido à importância da periostina na manutenção da integridade periodontal, o objetivo do estudo foi avaliar a influência do processo inflamatório crônico sobre os níveis teciduais de periostina. Para a metodologia e desenvolvimento do estudo foram utilizados 30 ratos divididos em grupo controle (logo após a indução da doença periodontal por ligadura), grupo de indução da doença após 2 semanas e grupo onde foi-se esperado 4 semanas. A doença periodontal induzida por ligadura foi desenvolvida através de um procedimento cirúrgico. Para a análise por Micro-CT Quantitativa,

foram feitos blocos levados à biópsia de cada período de tempo. As mandíbulas dos ratos foram fixadas e escaneadas e a seguir a perda alveolar óssea linear foi determinada na área interproximal entre o primeiro e segundo molar segundo alguns critérios. Foi feita também análise histológica e imunofluorescente para avaliação de neutrófilos polimorfonucleares e linfócitos-T, e níveis de periostina. Pode-se observar que os níveis de periostina foram reduzidos ao longo do tempo em resposta à ação inflamatória. Simultaneamente, a perda óssea aumentou com o passar do tempo. Portanto, os autores concluíram que os níveis de periostina no ligamento periodontal diminuíram sob uma resposta inflamatória crônica e correlacionaram o fato com as mudanças no periodonto ao longo do tempo.

Ainda com o objetivo de se estudar substâncias que poderiam estimular a viabilidade celular, Moazami et al. (2012) cultivaram fibroblastos de ligamento periodontal humano provenientes de terceiros molares sadios. A cultura celular foi feita em frascos contendo meio DMEM suplementado com soro fetal bovino e solução antibiótica e antimicótica até que houvesse um número de células suficiente para o subcultivo. O mesmo número de células foi depositado em placas de 24 poços e as mesmas foram levadas para estufa para permitir que os fibroblastos se aderissem ao fundo dos poços. As soluções experimentais colocadas em contato com os fibroblastos foram: G1- água destilada como controle, G2- meio DMEM suplementado com soro fetal bovino e antibiótico como grupo controle positivo, G3- HBSS (solução salina balanceada de Hank), G4- fórmula para bebês e G5- soymilk. As placas foram incubadas em estufa por 1, 2, 4 ou 8 horas. Após esses períodos, as placas foram removidas da estufa, as soluções foram removidas dos poços, as células foram coradas e levadas para o hemocitometro para contagem, sob microscopia, das viáveis e das não viáveis. O pH também foi avaliado. Posteriormente à análise estatística, os autores observaram que a fórmula para bebês, o HBSS e o soymilk mantiveram a viabilidade celular de forma parecida nos diferentes períodos de tempo. A água destilada (tap water) não conseguiu manter as células viáveis como as outras soluções. Sendo assim, pode-se concluir que tanto o soymilk quanto a fórmula para bebês podem ser recomendadas como meio de armazenamento para dentes avulsionados por até 8 horas.

No estudo de Manfrin et al. (2013), os autores avaliaram através de imunohistoquímica a expressão de OPG, RANK, e proteínas RANKL no processo de cura e reparo de dentes de ratos avulsionados e reimplantados imediatamente e tardiamente. Para o estudo foram utilizados 56 ratos de laboratório que foram sedados e anestesiados para a extração não-traumática do incisivo superior direito. A seguir os animais foram divididos em 4 grupos (controle, reimplante imediato, reimplante após 60 minutos sem nenhum tratamento e reimplante após 60 minutos com tratamento da superfície radicular e preenchimento do canal radicular com hidróxido de cálcio). Para o tratamento da superfície radicular, o ligamento periodontal aderido foi removido mecanicamente e o dente foi imerso em fluoreto de sódio acidulado a 2% por 20 minutos. Os alvéolos foram gentilmente irrigados com solução salina estéril e os dentes foram reimplantados. Após essa etapa, os ratos foram sacrificados depois de 10 e 60 dias depois do reimplante. Os dentes e os tecidos adjacentes foram removidos, fixados em formalina a 10% por 24 horas e descalcificados em EDTA 4,13%. Foram feitos cortes seriados de forma longitudinal, com 6 mm de espessura, que foram embebidos em parafina e corados com hematoxilina e eosina para análise histológica das características do ligamento periodontal, osso alveolar, cimento e dentina, assim como da ocorrência de reabsorção inflamatória, reabsorção por substituição e anquilose. Para análise imunohistoquímica, procurou-se a expressão de OPG, RANK e RANKL durante o processo de cura após o reimplante imediato e tardio. Através do estudo os autores observaram que houve a expressão de OPG e proteínas de RANKL em todos os grupos nos dois períodos de tempo com exceção do grupo II (após 60 minutos e sem tratamento da superfície radicular). A expressão de RANK pode ser observada somente no período de 10 dias. Sendo assim, pode-se concluir que quanto menor o tempo de espera para o reimplante do dente avulsionado, melhor a ação do sistema OPG-RANK-RANKL no início do processo de cura dos tecidos já que as células são estimuladas a produzir uma resposta após o procedimento cirúrgico.

Com o objetivo de se analisar a qualidade da ação do ácido hialurônico sobre variáveis clínicas, efeito antibacteriano e resposta local imune, Eick et al. (2013) selecionaram 34 pacientes voluntários com periodontite crônica e que foram avaliados durante 1 mês. No grupo teste (n = 17), após a raspagem e

aplainagem as bolsas periodontais receberam gel de ácido hialurônico 0,8% (AH 0,8%) pelo periodontista e , a seguir, os pacientes foram orientados a aplicar gel de ácido hialurônico 0,2% (AH 0,2%) na margem gengival duas vezes ao dia por 14 dias. No grupo controle (n = 17) não foi utilizado nenhum placebo, somente foi realizado a raspagem e aplainamento das raízes. Além disso, a profundidade de sondagem e o nível clínico de inserção foram mensurados no início do tratamento e após 3 e 6 meses. A placa gengival e amostras do fluido do sulco foram levadas a análise microbiológica e bioquímica. A detecção quantitativa de bactérias periodontopatogênicas foi realizada através de PCR em tempo real. Pode-se observar que o nível clínico de inserção e a profundidade de sondagem diminuíram significativamente ($p < 0,001$) e as mudanças na profundidade de sondagem, tal como o número de bolsas periodontais foi significativamente maior no grupo teste após 3 e 6 meses. Na análise microbiológica, pode-se notar que houve uma redução, após 6 meses, nas contagens de *Treponema denticola* em ambos os grupos enquanto que o *Campylobacter rectus* teve sua contagem reduzida somente no grupo teste. Portanto, os autores puderam concluir que o uso adjunto de ácido hialurônico ao tratamento de raspagem e alisamento das superfícies auxilia na prevenção da recolonização por bactérias periodontopatogênicas.

Outro estudo semelhante ao anterior avaliou histologicamente e imunohistoquimicamente a cronologia do processo de cura após o reimplante imediato de dentes de rato. Para o estudo, Panzarini et al. (2013) selecionaram 36 ratos que foram sedados e anestesiados para a extração não-traumática do incisivo superior direito de todos os animais. Os dentes foram mantidos em solução salina estéril por 15 minutos e, a seguir, foi feita a assepsia do alvéolo. Os dentes foram reimplantados e os ratos medicados. Após os períodos de 3, 7, 15, 28 e 60 dias os ratos foram sacrificados e as peças anatômicas contendo os dentes foram removidas, fixadas em formalina, descalcificadas em EDTA 4,13% e embebidas em parafina. Em seguida foram feitos cortes semiseriados longitudinais que foram corados em hematoxilina e eosina para análise histológica. Cortes adjacentes foram levados à análise imunohistoquímica para determinar a expressão de OP, OPG, RANK, RANKL e TRAP durante o processo de cura dos tecidos periodontais. A coloração foi classificada de acordo com uma

escala de intensidade. Os autores observaram na análise histológica a ruptura do ligamento periodontal e formação de um berço de sangue, que começou a ser substituído por tecido conjuntivo após 3 dias. Aos 7 dias, o epitélio da mucosa gengival foi reinserido e pode-se observar áreas de reabsorção radicular. Após 15 dias, o ligamento periodontal estava reparado. Em 3 dias, a polpa não apresentava a camada odontoblástica, devido à substituição por tecido conjuntivo. O tecido, em seguida, começou a se calcificar, preenchendo o canal entre 28 e 60 dias, fechando o ápice radicular. Na análise imunohistoquímica, houve grande expressão de OP, OPG e RANK nos períodos iniciais (0 e 3 dias), enquanto que a expressão de TRAP predominou em 28 e 60 dias. Portanto, pode-se concluir que se o reimplante ocorrer tardiamente haverá uma grande formação óssea nos períodos iniciais do processo de reparação, enquanto que a reabsorção óssea e a remodelação ocorrem em períodos mais avançados.

Recentemente, Pang et al. (2014) estudaram o efeito do EDTA na adesão e diferenciação de células-tronco da polpa dentária, já que se acredita que o EDTA induz a diferenciação dos odontoblastos pela liberação de fatores de crescimento provenientes da matriz dentinária. Para tal estudo, células-tronco de terceiros molares humanos foram cultivadas em meio alfa modificado por Eagle suplementado e utilizadas após a 3ª passagem. A expressão do antígeno de superfície de células-tronco mesenquimais foi analisada por citometria de fluxo. Os espécimes dentinários foram obtidos da dentina coronária dos terceiros molares usados na obtenção das células-tronco. A seguir, os espécimes foram tratados ou não com EDTA 17% por 1 minuto e as células foram plaqueadas sobre eles e cultivadas por 3 dias. Após esse período os espécimes foram retirados, colocados em nova placa de 6 poços, lavados e corados com tripano azul para contagem celular através de um hematocítômetro. A PCR Real Time foi utilizada para analisar a expressão de fibronectina, uma proteína chave da adesão. A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada pelos autores para observar a adesão celular. E, além disso, foi analisada também a diferenciação celular pela PCR Real Time e a calcificação da matriz extracelular pelo teste do Alizarin Vermelho. Após 3 dias os autores observaram que a densidade celular e a expressão de fibronectina foi maior no grupo onde os espécimes foram tratados com EDTA. Após 3 semanas as células-tronco no grupo tratado com EDTA

mostraram maior expressão de sialofosfoproteína e proteína da matriz dentinária 1 enquanto que as células cultivadas sem o contato com os espécimes tratados com EDTA não exibiram esses achados. Sendo assim, os autores concluíram que a aplicação de EDTA induz a adesão celular e a diferenciação de odontoblastos e osteoblastos.

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivo verificar a viabilidade de fibroblastos de ligamento periodontal plaqueados sobre discos radiculares (teste XTT) submetidos a tratamento com EDTA 17%, ácido hialurônico, colágeno e Emdogain[®], a quantificação de citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α pelo teste ELISA e, em caráter ilustrativo, observar em microscopia eletrônica de varredura a adesão dos fibroblastos à superfície de discos radiculares.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP via Plataforma Brasil, com número de parecer 367.966.

Durante o estudo foram realizadas duas etapas de protocolos de tratamento da superfície dos discos radiculares, a fim de se observar o melhor resultado de adesão e viabilidade dos fibroblastos do ligamento periodontal.

4.1 Preparo dos discos

Para o estudo foram utilizados 155 discos radiculares. Os dentes foram obtidos de doação e mantidos em água deionizada e em freezer até o momento da utilização. Os discos foram provenientes da raiz de dentes bovinos que tiveram ou não as superfícies radiculares externas raspadas com uma cureta periodontal tipo Gracey para descontaminação da superfície radicular. A seguir os dentes foram lavados e mantidos em água deionizada a uma temperatura de -18 °C até o momento da sua utilização.

Para a obtenção dos espécimes uma broca, adaptada à recortadora de amostras circulares (Figura 1) foi utilizada para realizar o corte sob refrigeração na face vestibular da superfície radicular dos dentes totalizando de dois a três discos por espécime. Cada disco possuía 2 mm espessura por 4,5 mm de diâmetro.

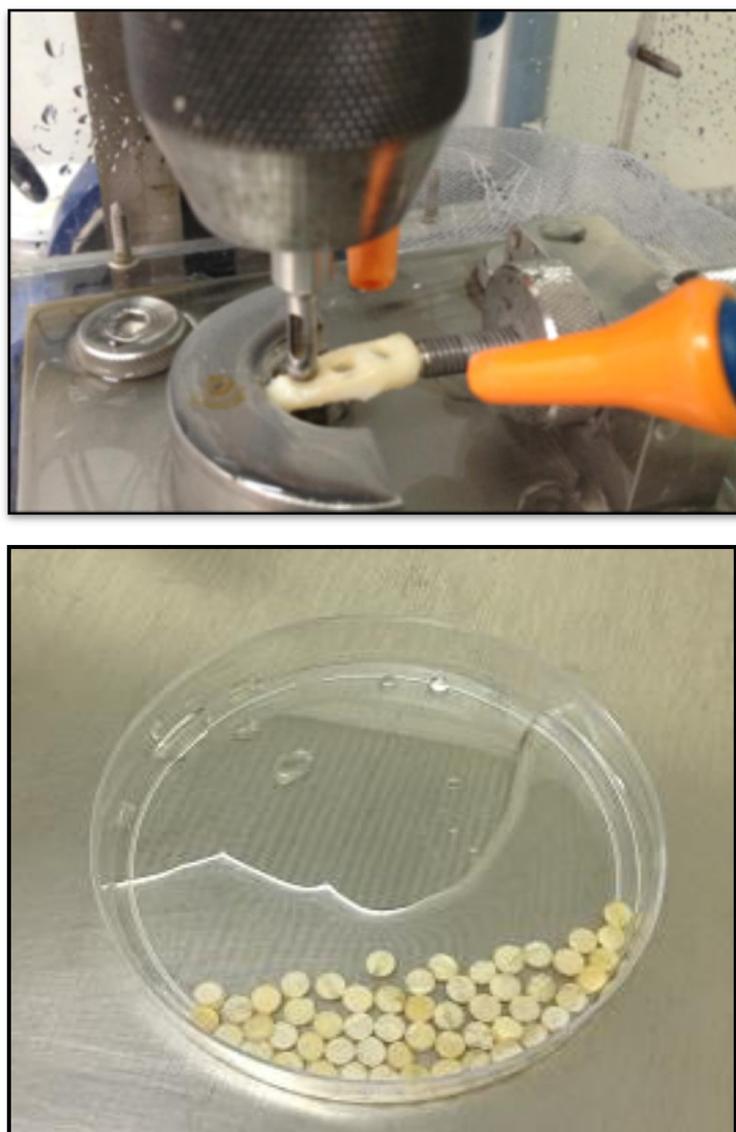


Figura 1 – Adaptação das raízes bovinas na recortadora de amostras circulares e obtenção dos discos de dentina e cimento.

Após o corte, os discos foram adaptados a dispositivos e regularizados em lixadeira polítriz (DP 10 – Panambra), com a superfície dentinária voltada para a lixa. Foram utilizadas lixas d'água de carbeto de silício de granulação crescente (1200 e 2500) com a finalidade de se obter uma superfície lisa, polida e uniforme. A seguir os discos foram limpos em cuba ultrasônica por 5 minutos (SoniClean 6 – Sanders do Brasil LTDA, Minas Gerais, Brasil) e autoclavados.

4.1.1 Primeira etapa do estudo: tratamento dos discos com EDTA 17%

Durante a primeira etapa do projeto os espécimes foram tratados com EDTA 17% (Biodinâmica Quim. e Farm. LTDA. Paraná, Brasil) e agitados ou não de acordo com o quadro abaixo:

Quadro 1 - Divisão dos grupos experimentais

N	Tratamento	Sob Agitação
12	Sem tratamento (controle)	Não
12	Com EDTA 17% (3 min)	Sim
12	Com EDTA 17% (3 min)	Não
12	Com EDTA 17% (5 min)	Sim
12	Com EDTA 17% (5 min)	Não

Nos espécimes que não receberam tratamento da superfície com EDTA 17%, foi utilizado somente o PBS como líquido de imersão. Pode-se observar também que em 2 grupos os discos foram agitados em agitadora de microplacas sem aquecimento Agimaxx AG-4PS (Biogen, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) durante o contato com o EDTA 17%.

Após o tratamento os discos foram lavados com 5 mL de PBS por 5 minutos que foram aspirados em seguida. A seguir os discos foram colocados em placas de 96 poços onde entraram em contato com as células para a realização dos testes de viabilidade por ensaio de XTT celular e microscopia eletrônica de varredura (Figura 2).

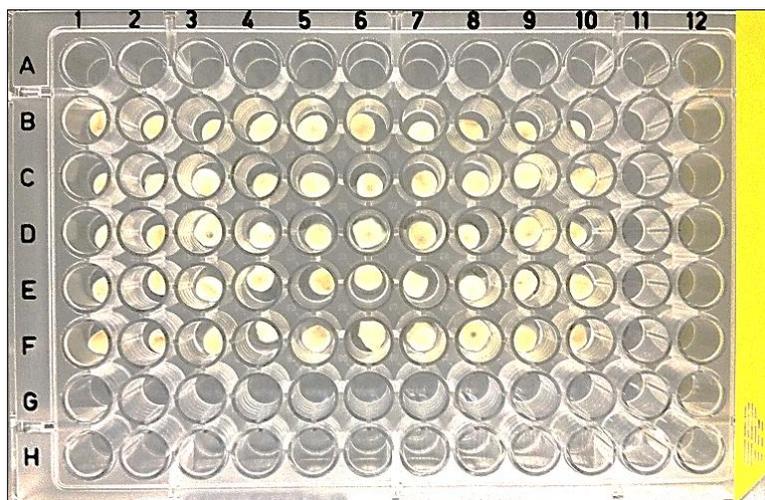


Figura 2 – Posicionamento dos discos na placa de 96 poços

4.1.2 Segunda etapa do estudo: tratamento dos discos com Endogaim[®], ácido hialurônico e colágeno

A segunda etapa do estudo consistiu no tratamento dos discos com Endogaim[®] (Straumann Brasil LTDA., São Paulo, Brasil), ácido hialurônico (HyStem, Sigma-Aldrich Brasil LTDA., São Paulo, Brasil) e colágeno (Collagen Human, Sigma-Aldrich Brasil LTDA., São Paulo, Brasil). Ficou estabelecido que o grupo que apresentou melhores resultados quanto ao teste XTT de viabilidade e sobrevivência celular na etapa anterior iria servir como protocolo para a segunda fase da pesquisa. Portanto, todos os grupos foram tratados com EDTA 17% por 5 minutos sem agitação. Os discos foram divididos em grupos de acordo com o protocolo do quadro 2.

Quadro 2 - Divisão dos grupos experimentais

N	Tratamento
10	Controle (EDTA 17%)
10	Endogaim
10	Ácido Hialurônico
10	Colágeno

Os materiais foram aplicados sobre os discos com auxílio de microbrush.

O experimento foi realizado em triplicata para melhor reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados.

A seguir foi realizado o teste de XTT para verificar a viabilidade celular. A microscopia eletrônica de varredura que seria realizada com 2 discos a mais por grupo não apresentou resultados na avaliação qualitativa da adesão dos fibroblastos sobre a superfície radicular. Para o ensaio de Elisa, para quantificação das citocinas IL-1 β , 1L-6, 1L-8, 1L-10 e TNF- α , 5 discos a mais por grupo receberam os tratamentos preconizados.

4.2 Cultivo das células

Foram utilizadas células de fibroblastos provenientes de cultura primária de ligamento periodontal (*PDL Cells*).

As células foram descongeladas e cultivadas em garrafas plásticas para cultivo celular, em meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, GIBCO/Invitrogen) suplementado com soro fetal bovino 10% (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil), com 150 U/mL de penicilina, 150 μ g/mL de estreptomicina e 0,125 μ g/mL de anfotericina (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil).

Em seguida, as células foram semeadas em frascos de cultura celular com filtro (Prolab, São Paulo, Brasil) e após a subconfluência da camada de células, estas foram destacadas com auxílio de solução de tripsina 0,25% diluída em solução salina de tampão de fosfato (PBS) (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil), a fim de reduzir a toxicidade da tripsina. Em seguida, essas células foram semeadas em novo frasco.

4.3 Descongelamento

Todos os procedimentos foram realizados dentro da capela de fluxo laminar (Grupo Veco, Campinas, Brasil). Em um frasco para cultura de célula com filtro (garrafa 75 cm² – 270 mL), foram pipetados 10 mL de meio de cultura; esse procedimento foi realizado com antecedência para que a tensão superficial do frasco e do meio fosse quebrada. No livro de registros do banco de células foram selecionados o puxador e a caixa do tambor de nitrogênio (Thermo Fisher Scientific Inc, EUA) que continham as células desejadas. Um tubo criogênico (Prolab, São Paulo, Brasil) foi removido e levado imediatamente para o banho-maria (Quimis, Aparelhos Científicos, Brasil) até o descongelamento total do seu conteúdo. As células foram inseridas no frasco para cultura previamente preparado e levadas ao microscópio de luz invertida (Quimis, Aparelhos Científicos, Brasil) para verificação da presença de células. Os frascos permaneceram em estufa com temperatura de 37 °C e tensão de CO₂ 5% (Thermo Fisher Scientific Inc, EUA).

4.4 Troca de meio

A cada 48 horas o meio de cultura foi trocado. As células foram removidas da estufa e verificadas no microscópio. O meio de cultura foi aspirado e em seguida as células foram lavadas com solução salina tamponada - PBS (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil) para remoção de células mortas. Um novo meio de cultura foi então adicionado ao frasco e as células novamente levadas à estufa.

4.5 Subcultura

A subcultura foi realizada quando as células cresceram a ponto de ocupar quase todo o frasco, ou seja, 80% de confluência. Desta forma, as células foram passadas de um frasco para dois ou mais, de acordo com o seu crescimento.

O meio de cultura presente no frasco de cultivo foi retirado com auxílio de um pipetador automático (High Tech Lab, Poland) e descartado em um tubo de ensaio. As células foram lavadas com 6 mL de PBS e em seguida foram adicionados 3 mL de tripsina (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil), uma substância utilizada para destacar as células do fundo da garrafa. O conjunto foi levado à estufa (Thermo Fisher Scientific Inc, United States) onde permaneceu por 5 minutos. Em seguida, foram aplicadas leves batidas no fundo do frasco apenas para auxiliar a remoção celular.

Após o período em estufa, 6 mL de meio de cultura foram adicionados sobre a tripsina para a sua neutralização. Todo este conteúdo foi levado para um tubo *Falcon* (TPP, Trasadingen, Suíça) e centrifugado por 5 minutos a 500 rcf para obtenção do “*pellet*”. O sobrenadante foi aspirado e as células foram ressuspensas em 1 mL de meio fresco. Após a homogeneização, a suspensão foi dividida em dois ou mais frascos de mesmo tamanho contendo 10 mL de meio de cultura, preparados previamente. Os frascos foram levados novamente à estufa, onde permaneceram até a troca de meio e/ou realização de uma nova subcultura. Esse procedimento foi realizado até que as células estivessem em quantidade suficiente para realização da contagem e do plaqueamento.

Foram utilizadas neste estudo células da quarta a décima passagem, evitando-se desta forma a utilização de células senescentes.

4.6 Contagem das células

A contagem de células foi realizada antes do plaqueamento a fim de que a mesma quantidade de células fosse colocada em cada poço das placas. Foram realizados os mesmos passos da subcultura até a obtenção do “*pellet*”; porém, as células foram ressuspensas em 10 mL de meio fresco. Desta suspensão foram retirados 10 μ L que foram levados para a câmara de Neubauer (Labor Optik

GmbH, Germany). A câmara foi levada ao microscópio de luz invertida para realização da contagem das células presentes nos quatro quadriláteros periféricos.

Para obtenção da quantidade de células por mL de meio de cultura, foi utilizada a seguinte fórmula: $C \times 10^4 = n^\circ \text{ células/mL}$, onde C correspondeu à média das células encontradas nos quadriláteros periféricos.

4.7 Plaqueamento

Após a verificação da quantidade de células necessárias para o estudo, foi realizado o plaqueamento em placas de 96 poços. Cada disco foi colocado em um poço da placa com a face dentinária voltada para baixo e 200 μL de meio com células foram adicionados ao poço de forma que todo o disco tivesse contato com o meio. A quantidade de células a ser utilizada foi definida em 8 mil células por 200 μL de meio utilizado (Figura 3).

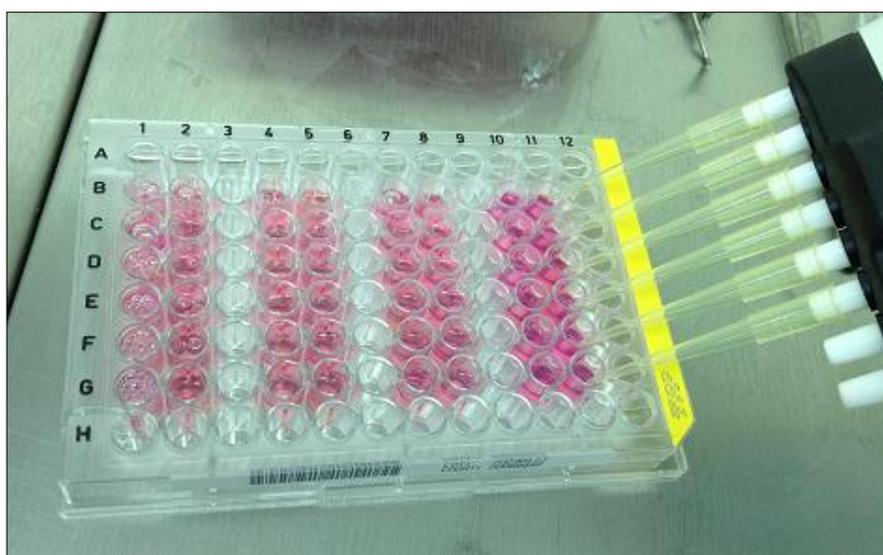


Figura 3 – Plaqueamento de 8000 células por poço sobre os discos tratados.

4.8 Ensaio XTT

O teste XTT baseia-se na habilidade de enzimas mitocondriais da atividade metabólica de células ativas em reduzir moléculas de 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) em sal solúvel formazan, de cor alaranjada detectável por uma absorbância de 480 nm (Scelza et al., 2012).

Dez discos de cada grupo foram submetidos ao teste do XTT.

O teste XTT iniciou-se com o preparo dos reagentes como descritos no quadro 3:

Quadro 3 - Protocolo utilizado para preparo dos reagentes

Reagente	Preparo
<p style="text-align: center;">XTT</p> <p style="text-align: center;">Menadiona</p>	<p style="text-align: center;">1 mg/mL PBS</p> <p style="text-align: center;">0,00069 g/mL de acetona</p>

Após o preparo dos reagentes foi preparada uma solução com XTT onde foram utilizados 200 µL por poço. A solução seguiu a seguinte proporção:

- 158 µL de PBS;
- 40 µL do reagente preparado XTT;
- 2 µL do reagente preparado menadiona.

Os discos foram removidos da placa de 96 poços, lavados em PBS e transferidos para placas de 96 poços, com 200 µL da solução de XTT em cada poço. As placas foram levadas à estufa por 3 horas a 37° C envolvida em papel alumínio devido à sensibilidade da solução à luz. Após este período os discos foram retirados dos poços e as placas foram levadas ao espectrofotômetro (Asys

Hitech GmbH, Áustria) para leitura dos resultados em comprimento de onda de 490 nm.

Os outros 2 discos foram preparados para microscopia eletrônica de varredura em M.E.V de baixo vácuo (Scanning Microscope – JSM – 840A jeol, Tóquio, Japão).

4.9 Preparo dos discos para M.E.V

Para a análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV), as células foram colocadas sobre os discos de dentina e cimento de 500 µm de espessura, já tratados, e incubadas em meio de Eagle modificado por DMEM 2 dias. As células foram fixadas em PBS contendo 2% (v/v) de glutaraldeído por 1 hora, desidratadas em sequência de etanol (10%, 25%, 50%, 75%, 90%) por 20 minutos em cada concentração e depois em etanol 100% por 1 hora e deixadas em estufa 37 °C por 24 horas para completa secagem. A seguir dois discos de cada grupo foram metalizados e analisados em MEV. Para isso, as amostras foram colocadas em uma Metalizadora Emitech SC7620 Sputter Coater, recebendo camada de liga de Au-Pd em vácuo de 8 nm.

Após, as amostras foram colocadas em stubs, fixados com fita carbono e posicionadas na câmara do Microscópio Eletrônico de Varredura Inspect S50 (FEI) e submetidas a vácuo. Foi utilizado o detector de elétron secundário LFD (Large Field Detector), bem como voltagem de 12.5 HV e Spot 5.

4.10 Quantificação de citocinas pelo teste de ELISA (ELISA - enzymelinked immunosorbent assay)

Para a quantificação de citocinas, 25 discos foram tratados de acordo com os materiais estudados e divididos em grupo controle (disco sem tratamento somente no meio de cultura com células), grupo EDTA 17%, grupo ácido hialurônico, grupo colágeno e grupo Endogaim. Foi adicionado também um grupo

controle negativo contendo somente o meio de cultura com as células. Os discos foram colocados em placas de 96 poços contendo 200 μL de meio de cultivo e 8000 células por poço e foi aguardado um período de 48 horas para o crescimento das mesmas.

O ensaio de ELISA foi realizado em dois dias com o uso de kits laboratoriais específicos (Human Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, EUA). No primeiro dia, 5 placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 μL de PBS e anticorpo de captura para cada citocina estudada (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α) e para o levantamento da curva padrão. As placas foram cobertas com filme plástico e deixadas sobre a bancada até o dia seguinte.

No segundo dia de teste, os poços foram lavados 3 vezes com 300 μL de solução tampão (tampão de lavagem) sendo esta composta por 980 mL de água destilada e 20 mL de Wash Buffer. A seguir, as placas foram batidas em guardanapo para completa secagem dos poços. O próximo passo foi a colocação de 300 μL de solução de bloqueio (ou reagente diluente) na proporção de 100 mL de PBS para 1 g de BSA. As placas ficaram em repouso por 1 hora. Enquanto isso, as curvas padrão de cada citocina foram preparadas (5 grupos com 5 amostras cada). Foram colocados 600 μL do reagente diluente nos primeiros eppendorfs de cada padrão e 300 μL nos demais (7 eppendorfs em cada caso). O anticorpo de captura foi colocado no 1º eppendorf de cada grupo, sendo que sua quantidade foi calculada de acordo com o manual do fabricante. A diluição foi realizada passando-se 300 μL do 1º eppendorf para o 2º e assim por diante.

Após essa 1 hora de repouso, as placas foram novamente lavadas 3 vezes com 300 μL de solução de lavagem e secas em guardanapo. Para a montagem das placas, foram colocados 100 μL do padrão nas duas primeiras colunas (duplicata) e 100 μL das amostras nos demais poços (também em duplicata). As amostras foram coletadas do sobrenadante dos poços plaqueados com células e discos tratados. Foi aguardado um período de duas horas com as placas tampadas sobre a bancada.

Novamente, após esse período, as placas foram lavadas 3 vezes com 300 μL de solução de lavagem e secas. Foram acrescentados 100 μL do anticorpo de detecção em cada poço (10 mL de PBS por placa e 55,56 μL do anticorpo de detecção). Mais uma vez, foi aguardado um período de 2 horas. A próxima etapa

consistiu na lavagem das placas 3 vezes com 300 μL de solução de lavagem, secagem das placas e aplicação de 100 μL de streptavidina em cada poço (na proporção de 85 μL de estreptavidina para 17 mL de PBS). As placas foram cobertas com papel alumínio e esperou-se 20 minutos. A seguir, as placas foram lavadas por 3 vezes com 300 μL de solução de lavagem, secas e foi acrescentado 100 μL da solução A+B (em quantidades iguais) por poço. As placas foram novamente envoltas por papel alumínio e esperou-se 20 minutos para a reação. O material dos poços não foi removido e foram adicionados 50 μL de solução stop (ácido sulfúrico 2N) em cada poço para parar a reação.

O desenvolvimento e a intensidade da cor foram quantificados levando-se as placas para um espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm (Figura 4).

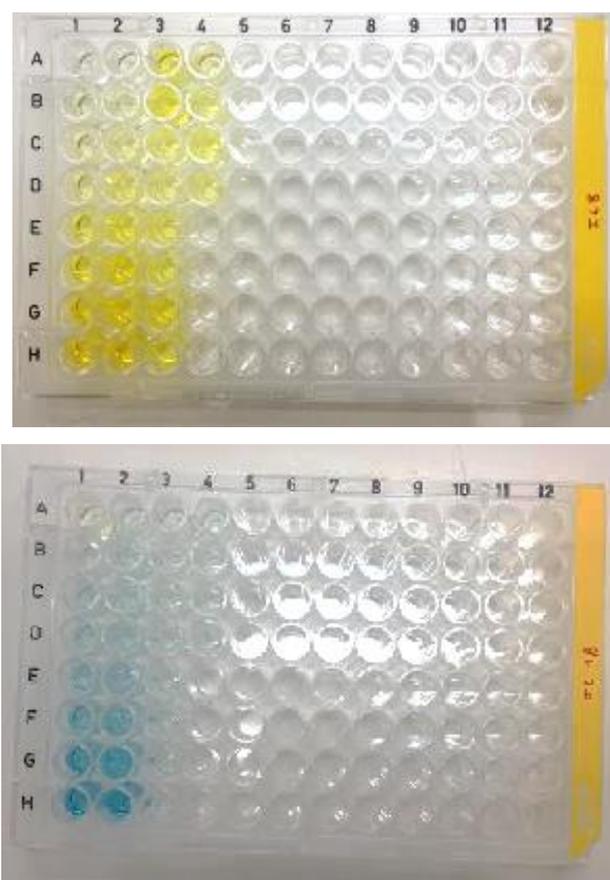


Figura 4 – Placas de 96 poços com curva padrão e amostras sensibilizadas para quantificação de citocinas (ensaio Elisa).

4.11 Análise estatística

Os testes ANOVA e Tukey, assim como os testes de Kruskal-Wallis e Dunn ($\alpha = 0,05$) (Graph Pad Prism for Windows-2006) foram utilizados para as análises estatísticas de viabilidade celular e expressão de citocinas.

5 RESULTADOS

Um estudo prévio a este foi realizado utilizando discos de dentina com cimento raspado e discos de dentina com o cimento íntegro. O único tratamento que os discos com cimento receberam antes do ensaio de XTT foi a colocação dos mesmos em 5 mL de solução de hipoclorito de sódio 2,5% por 1 hora para que o ligamento periodontal fosse dissolvido. Foram utilizados 30 discos separados em três grupos: sem cimento e sem aplicação de EDTA 17%, com cimento e sem EDTA 17% e com cimento e com EDTA 17% ($n = 10$). Os discos foram tratados com EDTA 17% por 5 minutos sem agitação e colocados em placas de 96 poços contendo 200 μ L de meio de cultura e 8000 PDLF *cells*. Após 48 horas, os discos foram transferidos para outra placa e 200 μ L de solução de XTT foram adicionados por poço para leitura em espectrofotômetro a 490 nm para verificação da viabilidade celular. Foi observado, através do teste ANOVA e Tukey, que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos contendo discos com cimento com o grupo sem cimento e sem EDTA 17% ($91,72 \pm 41,03$). Portanto, os grupos com cimento sem EDTA 17% ($194,1 \pm 49,69$) e com cimento com EDTA 17% ($193,1 \pm 52,29$) apresentaram melhores taxas de viabilidade celular demonstrando que a manutenção do cimento poderia ser um protocolo melhor de tratamento para dentes avulsionados (Figura 5). Porém, o propósito deste estudo foi verificar a viabilidade celular simulando dentes avulsionados reimplantados tardiamente, cujo protocolo já vem sendo pesquisado por outros autores.

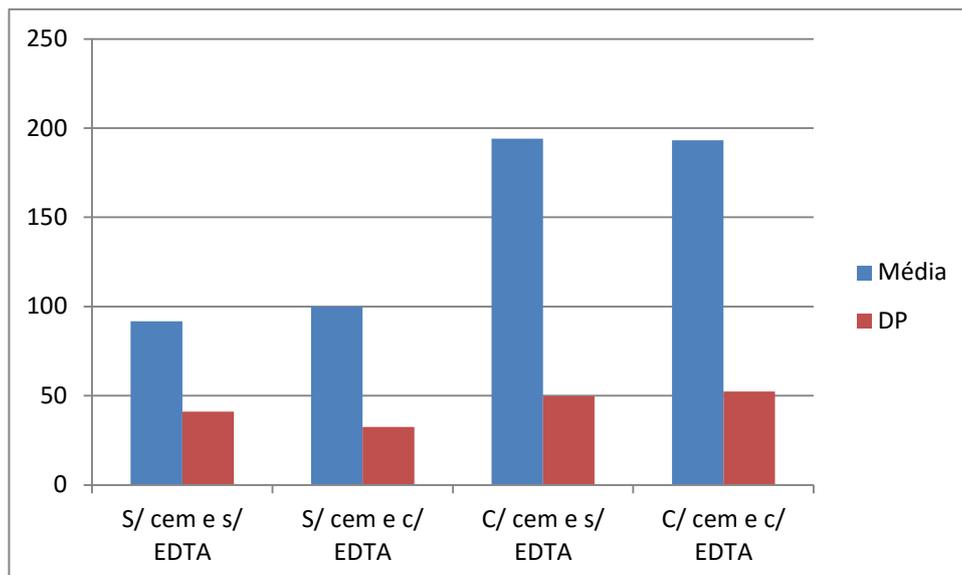


Figura 5 – Gráfico de média e desvio-padrão para os grupos do estudo piloto.

5.1 Primeira etapa do estudo (aplicação de EDTA 17% variando-se o tempo de aplicação e o fator agitação)

As variáveis experimentais para a avaliação da viabilidade e sobrevivência celular para a primeira etapa do estudo foram o tempo de contato do EDTA 17% com os discos de dentina radicular (3 minutos e 5 minutos) e o fator agitação ou não dos discos.

5.1.1 Estatística descritiva para a 1ª etapa do estudo

Na Tabela 1 se encontram os dados obtidos para a viabilidade celular através do ensaio de XTT dos espécimes tratados com EDTA 17% a 3 e 5 minutos, agitados ou não, em porcentagem (%) e na Tabela 2, a estatística descritiva para os mesmos.

Tabela 1 – Valores em porcentagem (%) para os dados obtidos de viabilidade celular após o tratamento dos discos na 1ª etapa

N	Controle s/t	Controle	3 COM	3 SEM	5 COM	5 SEM
1	197,77	88,55	105,08	128,69	122,79	109,80
2	199,62	63,75	93,27	97,99	120,43	106,26
3	264,62	83,83	93,27	115,70	106,26	193,62
4	83,56	88,55	67,30	135,77	97,99	97,99
5	211,69	101,53	100,35	94,45	96,81	107,44
6	197,77	88,55	102,72	103,90	158,21	139,32
7	184,77	99,17	73,20	95,63	101,53	170,01
8	183,84	110,98	74,38	152,30	106,26	127,51
9	253,48	89,73	85,01	93,27	96,81	142,86
10	163,41	185,36	81,46	81,46	96,81	167,65
Média	194,05	100	87,6	110	110	136
DP	49,69	32,5	13,3	22,5	19,3	32,4

3 COM – 3 minutos com agitação em agitadora de microplacas;

3 SEM – 3 minutos sem agitação;

5 COM – 5 minutos com agitação em agitadora de microplacas;

5 SEM – 5 minutos sem agitação;

s/t – discos com cimento e sem tratamento;

Controle – discos sem cimento e com EDTA 17%.

Tabela 2 - Estatística descritiva para os dados obtidos na 1ª etapa do estudo

	Controle s/t	Controle	3 COM	3 SEM	5 COM	5 SEM
N	10	10	10	10	10	10
Mínimo	83,56	63,8	67,3	81,5	96,8	98,0
Mediana	197,8	89,1	89,1	101	104	133
Máximo	264,6	185	105	152	158	194
Média	194,1	100	87,6	110	110	136
Desvio-padrão	49,69	32,5	13,3	22,5	19,3	32,4
Coeficiente de variação	25,60%	32,46%	15,22%	20,48%	17,51%	23,77%

5.1.2 ANOVA e Teste de Tukey para a 1ª etapa do estudo

Pela ANOVA (Tabela 3), observou-se que houve diferenças estatísticas no que diz respeito aos dois fatores avaliados, com desempenho superior para a ausência de agitação e para o tratamento por 5 minutos. Adicionalmente, observou-se que o somente o grupo com a associação dos dois fatores (5 minutos sem agitação), foi o único que se diferenciou estatisticamente do grupo controle (Tabela 4 e Figura 6).

Tabela 3 – ANOVA (Análise de Variância)

ANOVA	SS	DF	MS	F(DFn, DFp)	P
Tratamento entre colunas	73361	5	14672	F (5,54)=15,6	P < 0,0001
Resíduos	50663	54	938		
Total	124023	59			

Tabela 4 – Teste de Tukey

Grupos	Diferença média	Significância	p< .05
Controle vs. 3 COM	12,4	Não	0,6207
Controle vs. 3 SEM	-9,92	Não	0,6207
Controle vs. 5 COM	-10,4	Não	0,6207
Controle vs. 5 SEM	-36,2	Sim	0,0094
Controle vs. Controle s/t	-94,1	Sim	<0,0001

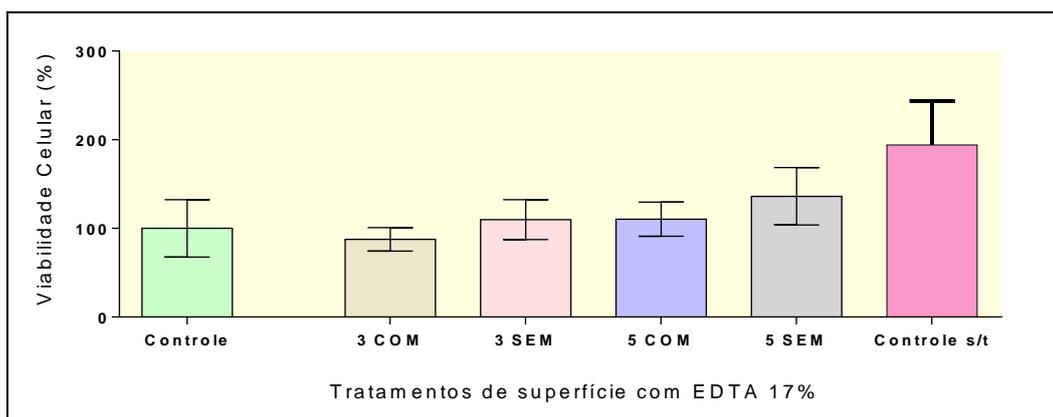


Figura 6 – Gráfico de viabilidade celular X tratamentos de superfície ilustrando a diferença estatística entre o grupo 5 SEM com os demais grupos.

5.1.3 Microscopia eletrônica de varredura (M.E.V.)

Quanto à microscopia de varredura, os dados apresentados seriam de forma qualitativa, uma vez que não foi possível estabelecer diferenças visuais entre os grupos. Desta forma, pode-se observar na Figura 7 que as células mantiveram as características fusiformes e com prolongamentos se aderindo à superfície radicular tratada, de forma que pode-se afirmar que nenhum dos tratamentos provocou indícios de citotoxicidade absoluta.

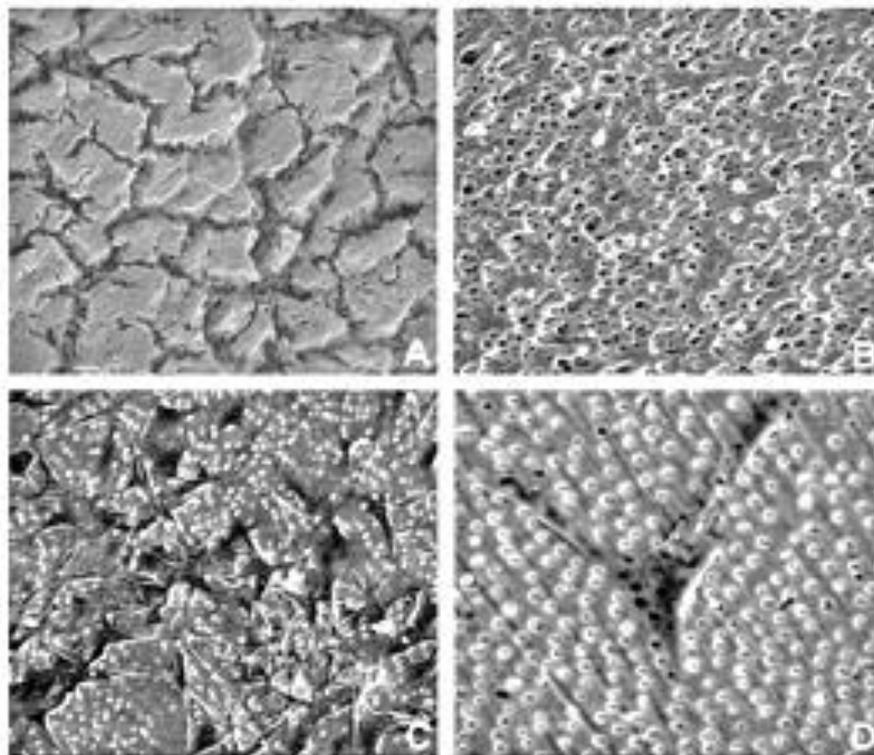


Figura 7 – Imagem em Microscopia Eletrônica de Varredura dos fibroblastos de ligamento periodontal. A) Cimento radicular após aplicação de EDTA 17% por 3 minutos com agitação (1000x); B) Disco do grupo controle (1051x); C) Disco do grupo controle com adesão de fibroblastos sobre a superfície (1051x); D) Disco tratado com EDTA 17% com adesão de fibroblastos (2000x).

5.2 Estatística descritiva para a 2ª etapa do estudo

Na Tabela 5 se encontram os dados obtidos para a viabilidade celular através do ensaio de XTT dos espécimes tratados com EDTA 17% a 5 minutos sem agitação (controle), Endogaim[®], colágeno e ácido hialurônico, em porcentagem (%). Já na Tabela 6 podemos observar a estatística descritiva para os dados obtidos.

Tabela 5 – Valores em porcentagem (%) para os dados obtidos de viabilidade celular após o tratamento dos discos na 2ª etapa

N	Controle (EDTA 17%)	Emdogain®	Colágeno	Ácido hialurônico
1	90,75	129,34	206,78	264,53
2	96,07	82,23	129,34	217,16
3	106,18	101,92	184,16	256,28
4	106,98	99,53	139,09	163,21
5	72,19	74,42	157,57	147,3
6	94,61	105,04	106,41	138,92
7	94,61	104,53	158,28	125,56
8	101,58	95,76	108,6	103,12
9	114,08	85,82	78,45	85,99
10	116,14	86,33	87,36	85,13
Média	99,32	96,49	135,6	158,7
DP	12,81	15,5	41,7	66,31

Tabela 6 – Estatística descritiva para os dados obtidos na 2ª etapa do estudo

	Controle (EDTA 17%)	Emdogain®	Colágeno	Ácido Hial
N	10	10	10	10
Mínimo	72,19	74,42	78,45	85,13
Mediana	98,83	97,65	134,2	143,1
Máximo	116,1	129,3	206,8	264,5
Média	99,32	96,49	135,6	158,7
Desvio-padrão	12,81	15,5	41,7	66,31
Coeficiente de variação	12,89%	16,07%	30,75%	41,78%
Soma	993,2	964,9	1356	1587

5.2.1 Kruskal-Wallis e Teste de Dunn

Quando os dados obtidos foram tratados com o teste ANOVA, um teste paramétrico pode-se observar diferença estatisticamente significativa entre os desvios-padrões de cada grupo ($p < 0,05$). Sendo assim, foi aplicado o teste não

paramétrico de Kruskal-Wallis para análise entre os grupos ($p = 0.0141$). Foi observado que não houve diferença entre os diferentes tipos de tratamentos com o grupo controle (EDTA 17% por 5 minutos sem agitação), porém houve diferença entre o grupo Emdogain® e o ácido hialurônico que mostrou melhor compatibilidade com os fibroblastos do ligamento periodontal (Tabela 7 e Figura 8).

Tabela 7 – Teste de Dunn

Grupos	Diferença média	Significância	$p < .05$
controle vs. Emdogain	2,65	Não	$> 0,9999$
controle vs. Colágeno	-9,85	Não	0,3576
controle vs. Ácido Hial	-11,2	Não	0,1932
Endogaim vs. Colágeno	-12,5	Não	0,101
Endogaim vs. Ácido Hial	-13,85	Sim	0,0485
Colágeno vs. Ácido Hial	-1,35	Não	$> 0,9999$

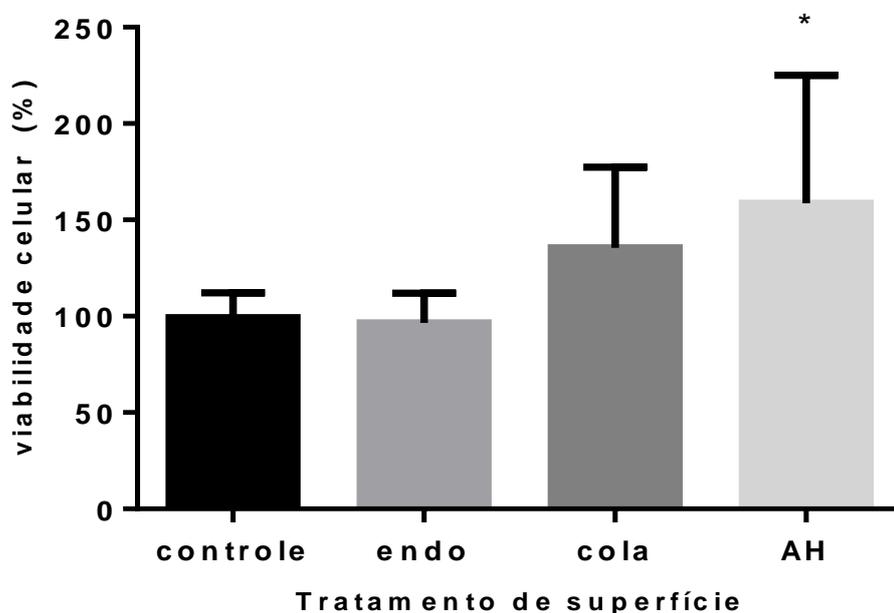


Figura 8 – Gráfico de viabilidade celular X tratamentos de superfície para a 2ª etapa do estudo.

5.3 ELISA

O teste de Elisa foi realizado para avaliar a expressão das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α pelos fibroblastos do ligamento periodontal frente às substâncias testadas (EDTA 17%, Emdogain, colágeno e ácido hialurônico). Podem-se observar nas figuras 9, 10 e 11 as curvas padrão para cada citocina e sua expressão. Nas figuras 12 e 13 observamos somente os gráficos das curvas padrão para a IL-10 e TNF- α já que não houve expressão destas citocinas no teste de ELISA.

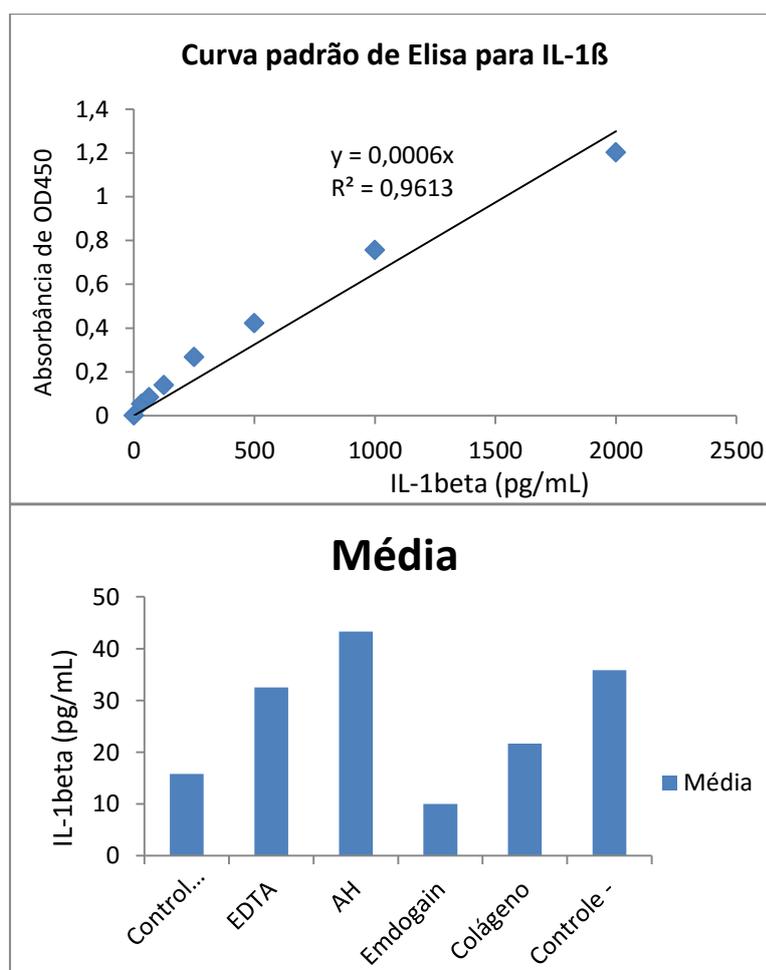


Figura 9 – Gráficos de curva padrão e média para interleucina 1 β em PDLF cells.

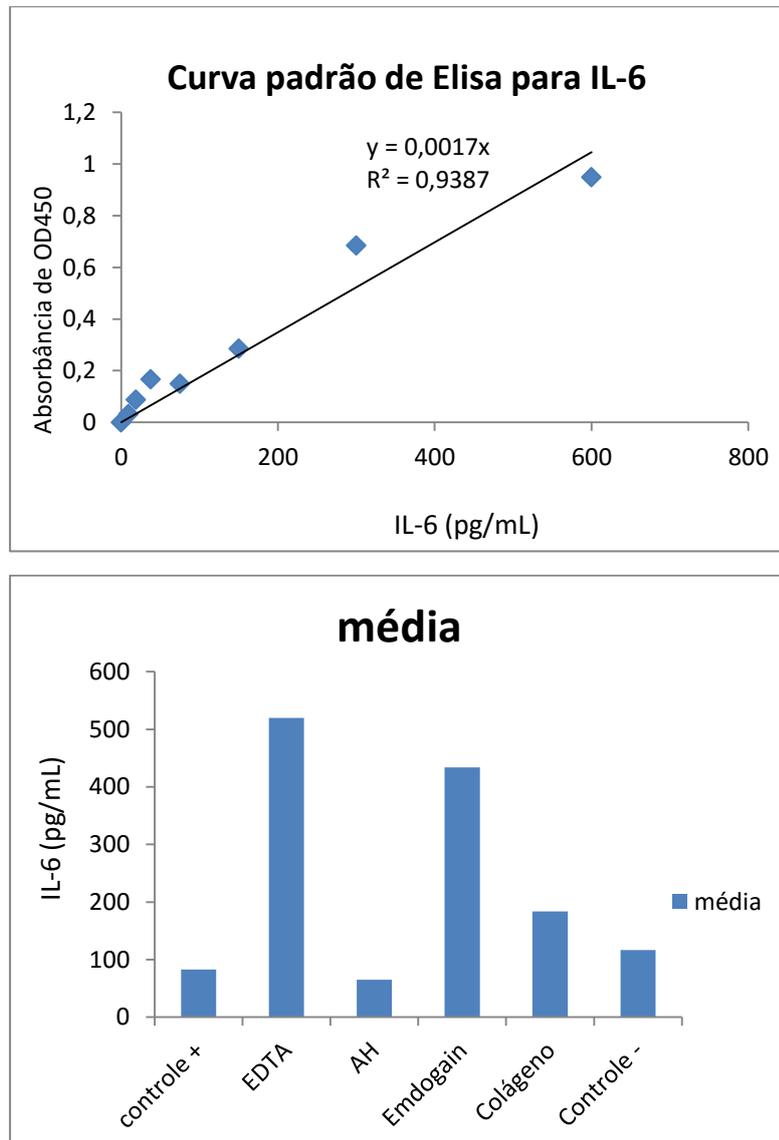


Figura 10 – Gráficos de curva padrão e média para interleucina 6 em PDLF cells.

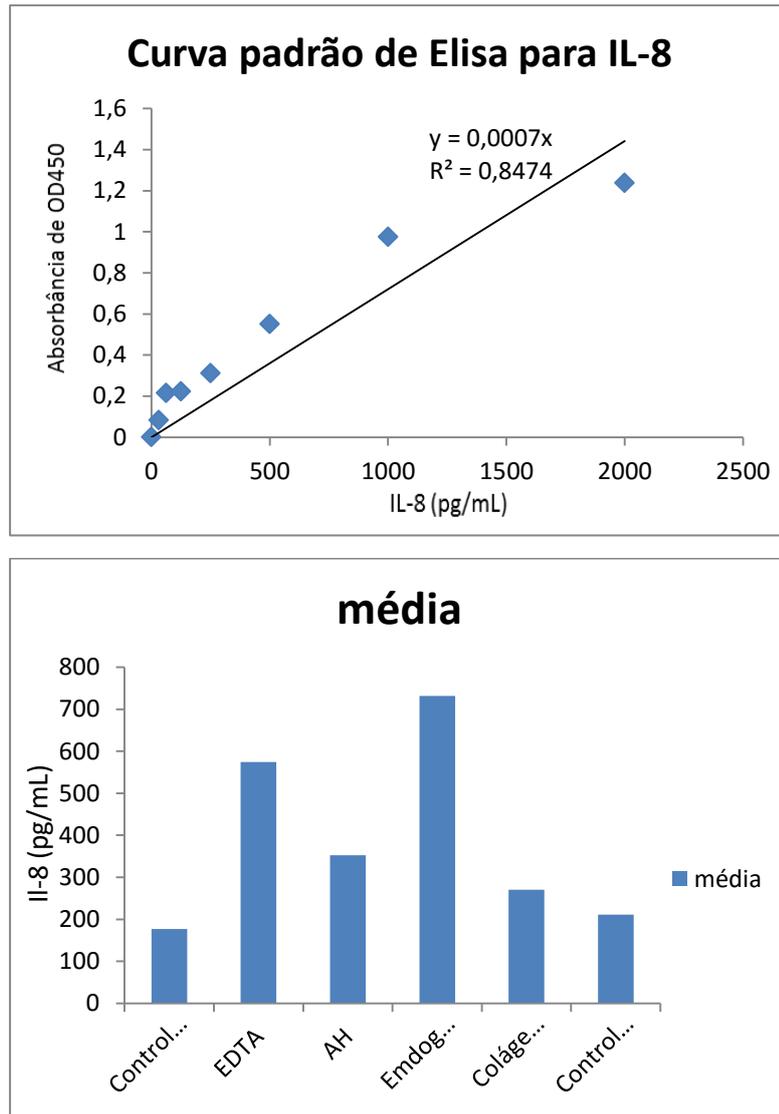


Figura 11 – Gráficos de curva padrão e média para interleucina 8 em PDLF cells.

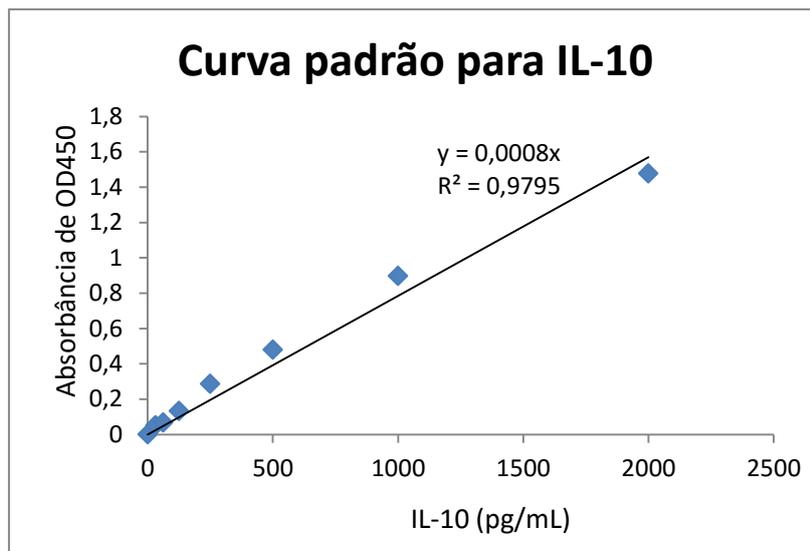


Figura 12 – Gráficos de curva padrão para a interleucina 10 em PDLF *cells*.

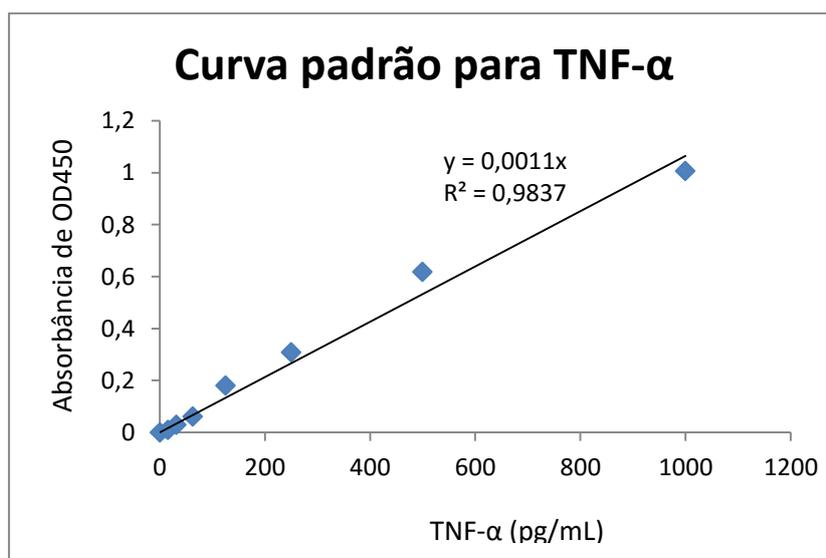


Figura 13 – Gráficos de curva padrão para fator de necrose tumoral – α em PDLF *cells*.

5.3.1 ANOVA e Tukey

Aplicando-se o teste ANOVA e Tukey para cada citocina isoladamente, fez-se uma comparação entre os grupos e pode-se observar que somente a interleucina-6 e a interleucina-8 apresentaram diferenças estatisticamente

significantes. Dentro da IL-6, o grupo EDTA 17% (0.9580 ± 0.185) diferiu do grupo controle positivo (0.2150 ± 0.028) e do grupo tratado com ácido hialurônico (0.1850 ± 0.353) ($p < .05$), ou seja, o tratamento com EDTA 17% expressou maiores níveis de IL-6 quando comparado com os demais (Figura 14).

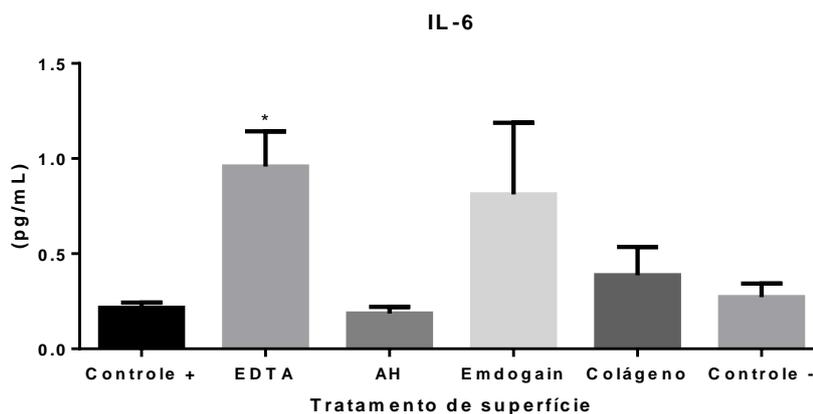


Figura 14 – Gráfico de média e desvio-padrão para a IL-6 (ANOVA)

A IL-8 apresentou diferenças estatisticamente significantes entre o grupo EDTA 17% e o grupo tratado com colágeno, o controle positivo e o controle negativo, e entre o Emdogain e os demais grupos com exceção do grupo tratado com EDTA 17% (Figura 15).

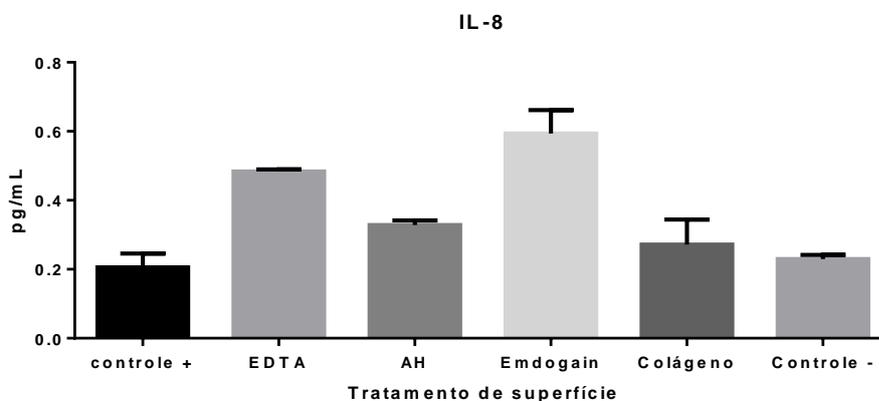


Figura 15 – Gráfico de média e desvio-padrão para a IL-8 (ANOVA).

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV) para verificar a presença ou não de fibroblastos do ligamento periodontal sobre os discos de dentina e cimento após o tratamento com as substâncias preconizadas, assim como Hakki et al. (2010) que utilizou as imagens do MEV de forma qualitativa para avaliar a morfologia e adesão celular em superfícies radiculares. Da mesma forma, Oliveira et al. (2012) e Bolortuya et al. (2012) utilizaram imagens de MEV para visualização da adesão de componentes sanguíneos e adesão de fibroblastos após a irradiação com laser sobre a superfície radicular. Yang et al., em 2012, empregaram o uso da microscopia para analisar a diferenciação e proliferação celular em scaffolds. Sendo assim, podemos observar que há na literatura vários estudos que mostram a eficácia da microscopia eletrônica de varredura para visualização celular sobre estruturas dentárias.

Para o teste de viabilidade dos fibroblastos do ligamento periodontal, adotamos o teste de XTT que é um ensaio de citotoxicidade que se baseia na habilidade de enzimas mitocondriais da atividade metabólica de células ativas em reduzir moléculas de 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide em sal solúvel formazan de cor alaranjada (Scelza et al., 2012).

As formazanas são excessivamente insolúveis em água, portanto, foi desenvolvido o corante derivado de MTT, o XTT, que produz formazanas mais intensamente coloridas e solúveis em água, facilitando assim a leitura no espectrofotômetro (Barltrop, Owen, 1991). O uso de XTT simplifica muito o processo de medição da proliferação, e é, portanto, uma excelente solução para a quantificação e viabilidade celular sem usar isótopos radioativos.

Por fim, o ensaio de ELISA, um teste imunoenzimático que se baseia na interação antígeno-anticorpo para detecção de anticorpos específicos, foi utilizado neste estudo com o objetivo de se detectar a presença ou não de algumas citocinas pró e anti-inflamatórias expressas pelos fibroblastos após o contato com determinadas substâncias. Diomedea et al., em 2014, utilizaram o teste de ELISA para detectar citocinas próinflamatórias após a exposição de células à um cimento

à base de metacrilato, assim como Shibata et al., também em 2014, utilizou do mesmo ensaio para verificar a presença das citocinas em fibroblastos do ligamento periodontal humano.

6.1 Estimulação biológica e adesão celular

O ligamento periodontal suporta estruturalmente o dente e é composto por um tecido conjuntivo não mineralizado entre o osso alveolar e o cimento, desempenhando um papel importante na manutenção e renovação dos tecidos periodontais (Wu et al., 2015).

Nos últimos anos as pesquisas têm sido dirigidas em busca de um tratamento eficaz para a superfície radicular de dentes que sofreram avulsão traumática e que foram reimplantados tardiamente, na esperança de que os danos causados às estruturas de suporte, ou seja, ao ligamento periodontal, sejam mínimos ou nulos. A engenharia de tecido dentário requer três elementos básicos: uma fonte de células adequada, uma estrutura de suporte biodegradável para servir como uma matriz extracelular temporária (ECM) e sinais de funcionamento ótimos para a célula (Yang et al., 2011).

O reimplante de um dente avulsionado vai permitir a manutenção da espessura e altura do osso alveolar, mesmo que a anquilose e a reabsorção por substituição ocorram (Poi et al., 2007). As substâncias empregadas com fins terapêuticos sobre a superfície radicular devem possuir características bactericidas/bacteriostáticas, além da capacidade de promover a sobrevivência e a proliferação celular (Trevino et al., 2011). Entretanto, devido à complexidade dos tecidos envolvidos, o reparo e cura da área afetada não são ainda um processo de absoluto sucesso (Panzarini et al., 2013).

As células do ligamento periodontal humano (PDLF *cells*) são conhecidas por regular a homeostase e formar proteínas estruturais de colágeno, além de possuírem funções regulatórias na imunidade inata. São capazes também de regular a gênese de osteoclastos, expressar proteínas da matriz óssea e formar agregados mineralizados *in vitro* (Liu et al., 2015). De acordo com Lindskog et al.

(1983), como os fibroblastos não são capazes de aderir à superfície dentinária, a formação de cimento acelular é de suma importância para a reorganização do ligamento periodontal funcional. No presente estudo foi utilizada uma cureta Gracey #15 para a gentil raspagem da raiz com o objetivo de remover os remanescentes do ligamento periodontal necrótico, visando sempre a simulação de avulsão com reimplante tardio. No estudo de Gulinelli et al. (2008), os autores realizaram a raspagem das superfícies com uma lâmina de bisturi como parte do tratamento da superfície. Os autores alegam que esta técnica é fácil de realizar e preserva a camada de cimento, o que foi considerado uma barreira importante para a o controle da reabsorção externa (Lindskog, Hammarström, 1980). Por outro lado, a necrose do ligamento periodontal leva à perda de estruturas importantes, tais como os restos epiteliais de Malassez, cementoblastos e pré-cimento, que parecem ter um papel importante na preservação do espaço periodontal (Gulinelli et al., 2008). Hakki et al. (2010) também realizaram a raspagem da superfície radicular pois os autores constataram que as pesquisas com descontaminação e modificação da raiz dentária melhoram a resposta das terapias periodontais favorecendo a adesão de células críticas à formação de tecido periodontal. Além disso, sabe-se que a superfície radicular com doença periodontal inibe a adesão de fibroblastos do ligamento (Schwarz et al., 2009). Um fato contraditório à essas últimas afirmações são os resultados obtidos no estudo piloto que mostram melhores taxas de viabilidade celular quando as células são semeadas sobre discos de dentina e cimento não raspado. O editorial de Andersson et al. (2012) mostra uma técnica para reimplante tardio que consiste na remoção do tecido mole não viável de forma cuidadosa, exemplificando com o uso de gaze. O que pode justificar os melhores resultados no estudo piloto é a capacidade do fibroblasto em se diferenciar em cementoblasto ou odontoblasto, portanto, quando utilizamos curetas para raspar o tecido necrótico, objetivamos a remoção do tecido necrosado e não viável, porém alteramos a estrutura da raiz. O estudo teve seguimento com a proposta inicial, pois a intenção era verificar novas possibilidades para o tratamento de dentes avulsionados e reimplantados tardiamente.

O objetivo do presente estudo, na sua primeira etapa, foi avaliar o crescimento celular, por meio do teste de XTT, do EDTA 17%, sob agitação ou

não, em contato com discos de dentina radicular sobre fibroblastos do ligamento periodontal (*PDLF*) e a característica da adesão dos mesmos por meio de microscopia eletrônica de varredura. Ressalta-se que a literatura é rica em exemplos de substâncias testadas, como vitamina C, fluoreto de sódio, extrato de própolis e mesmo misturas de hidróxido de cálcio (Panzarini et al., 2005; Poi et al., 2007; Gulinelli et al., 2008; Trevisan et al., 2011) e, em nosso estudo, optamos pelo EDTA por este ser um quelante efetivo com proeminente ação lubrificante e largamente utilizado na terapia endodôntica (Çalt, Serper, 2002).

Pode-se observar, por microscopia eletrônica de varredura (MEV), a adesão das células *PDLF* sobre a superfície cementária sem que houvesse diferença entre os grupos. Sendo assim, o presente estudo observou a morfologia das células e ilustrou, qualitativamente, a adesão das mesmas sobre os discos (Figura 7). No estudo de Prasad et al. (2012), pode-se observar também por MEV, a capacidade do EDTA 17% em eliminar a smear layer de raízes previamente expostas à doença periodontal e em abrir os túbulos dentinários. Em concordância com o nosso estudo, os autores afirmaram que os agentes desmineralizantes podem ser usados nas superfícies radiculares na tentativa de se restabelecer a biocompatibilidade das raízes atuando como agentes condicionadores.

Através do teste de XTT, que objetiva avaliar a atividade metabólica das células, pode-se observar que no grupo onde os discos estiveram em contato com o EDTA 17% por 5 minutos sem agitação, a viabilidade celular foi maior diferenciando-se do grupo controle. Ressalta-se que essa tendência foi observada também na análise de variância, onde os fatores tempo e agitação influenciaram nessa diferença estatística. Uma hipótese é que tanto o aumento do tempo de aplicação quanto o “descanso” da superfície radicular em solução de EDTA, permitiriam um contato mais efetivo entre a superfície, melhorando a ação quelante, e conseqüentemente a adesão e proliferação celular do ligamento periodontal.

Por meio de análise imunohistoquímica, Trevino et al. (2011), avaliando a citotoxicidade de substâncias irrigadoras sob cultura de células da papila apical, observaram que o EDTA 17% apresentou os melhores resultados de viabilidade celular quando comparado aos demais grupos. Huang et al. (2012), estudando a

propriedade de molhabilidade de substâncias irrigadoras, constataram que o uso de EDTA 17% por 1 minuto não foi o suficiente para produzir tal efeito na superfície dentinária, e é essa propriedade que promove a sobrevivência das células e a sua adesão às estruturas (Wang et al., 2009; Ke et al., 2010). Além disso, a ação quelante do EDTA é capaz de liberar fatores de crescimento derivados da dentina capazes de induzir a proliferação, a sobrevivência e a diferenciação celular (Roberts-Clark, Smith, 2000; Pang et al. 2014). Sendo assim, podia-se esperar que o maior tempo de aplicação do EDTA 17% sob a superfície cementária produzisse melhores resultados.

As demais substâncias utilizadas no nosso estudo foram empregadas com o intuito de tratar a superfície radicular após a raspagem do cimento, que simulou uma condição de necrose e contaminação após exposição em meio extra-alveolar por tempo maior que 60 minutos. Já no ano de 1981, Andreasen afirmou que a combinação de infecção bacteriana dentro do canal radicular e lesão cementária na superfície radicular externa resultam, na maioria dos casos, em reabsorção inflamatória externa, o que leva ao insucesso no reimplante dentário.

Dentro deste contexto utilizamos o Emdogain[®] na superfície radicular por se tratar de um gel terapêutico que consiste em matriz derivada do esmalte e amelogeninas de uma família de proteínas hidrofóbicas, em veículo de alginato propilenoglicol que é bastante utilizado em cirurgias periodontais por atingir a regeneração biológica da adesão do dente pela promoção da migração, proliferação e diferenciação de fibroblastos do ligamento periodontal para cobrir a superfície radicular exposta (Mellonig, 1999; Pontoriero et al., 1999; Poi et al. 2007). O Emdogain[®] tem sido amplamente utilizado para mimetizar a cementogênese, restaurando completamente a função do ligamento periodontal, cimento e osso alveolar em pacientes com periodontite severa (Lyngstadaas et al., 2001). Sua constituição permite que se forme uma matriz extracelular insolúvel com grande afinidade por hidroxiapatita e colágeno e com grande potencial para suportar interações com células em tecidos adjacentes (Lyngstadaas et al., 2001; Fincham et al., 1994; Gestrelus et al., 1997).

Já o ácido hialurônico é um glicosaminoglicano não sulfatado e linear, consistindo em unidades repetidas de (β ,1-4) ácido glucurônico-(β ,1-3)-N-acetil glucosamina (Takeda et al., 2011) e é um componente principal da matriz extracelular (Jiang et al., 2011). Em um estudo de Takeda et al. (2011) observaram que scaffolds de ácido hialurônico empregados em dentes de cachorros, foram promotores da adesão e proliferação de fibroblastos do ligamento periodontal. O ácido hialurônico (AH) pode ser empregado em *scaffold* devido à sua ação na funcionalidade da matriz extracelular. Produzido também pelos fibroblastos, o AH contribui significativamente na hidrodinâmica tecidual, na migração celular e na sua proliferação (Bansal et al., 2010).

Foi observado em nosso estudo que o ácido hialurônico promoveu melhores resultados no teste de citotoxicidade sendo, portanto, mais biocompatível com os fibroblastos do ligamento periodontal que as demais substâncias empregadas na pesquisa. Estatisticamente, o ácido hialurônico diferiu do grupo Emdogain[®], como visto na figura 8. Além disso, Woodard et al. (2007) e Zand et al. (2010) afirmam que o espalhamento apropriado dos cristais de hidroxiapatita melhoram a fixação inicial das células sobre um substrato.

Por outro lado, o colágeno apresentou bons resultados de viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal, porém, se comparado aos demais grupos, não apresentou diferença estatisticamente significativa e nem se mostrou o melhor material. O colágeno tem ação benéfica esperada sobre tecidos duros devido à seu alto grau de grupos funcionais biológicos e tem potencial para ser usado em *scaffolds* (Kujipers et al., 2000). Além disso, foi um material de escolha no nosso estudo por ser principal constituinte da matriz extracelular e, sob o colágeno, era esperado que os fibroblastos do ligamento periodontal humano apresentasse morfologia fusiforme, funcionalidade e distribuição tal como o estudo de Alves et al. (2015). Rungsiyanont et al. (2012) observaram em seu estudo que a utilização de um arcabouço de colágeno e hidroxiapatita associada ao colágeno atraiu e foi capaz de fixar fibroblastos de ligamento periodontal humano ao *scaffold* sem causar danos tóxicos às mesmas. Em outro estudo realizado no mesmo ano, Yang et al. observaram que o colágeno/quitosana e outras moléculas foram capazes de prover um ambiente propício ao crescimento das células do ligamento

periodontal, mostrando-se um material com alto potencial de uso na regeneração tecidual.

Diante dos resultados obtidos, tanto no estudo piloto quanto no estudo experimental, confirmamos a hipótese de que as substâncias testadas aumentariam a viabilidade celular dos fibroblastos do ligamento periodontal. Entende-se também que é necessário realizar novos estudos variando-se os meios de descontaminação do cimento sem que o mesmo seja raspado e outras substâncias, aplicando-se novos testes.

6.2 Influência dos tratamentos físico-químicos na expressão de citocinas

Segundo Preshaw e Taylor (2011), citocinas são proteínas solúveis que se ligam às células-alvo através de receptores específicos, iniciando uma cascata de sinalização intra-celulares resultando em mudanças no fenótipo celular. São proteínas eficazes em baixas concentrações e produzidas de forma transitória atuando, primeiramente, nos tecidos onde são produzidas.

As citocinas inflamatórias, como o TNF- α (fator de necrose tumoral- α) IL-6 e IL-8 participam de uma importante função na modulação dos sistemas inflamatórios. São produzidas não somente pelas células imunes (linfócitos, monócitos e macrófagos), mas também por células epiteliais, endoteliais e fibroblatos (Wu et al., 2015).

A interleucina 8 é conhecida como uma citocina pró-inflamatória que participa da defesa do hospedeiro, bem como em vários graus de danos ao tecido, através do seu envolvimento no recrutamento de neutrófilos, adesão celular, angiogênese e crescimento tumoral. É produzida principalmente por queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais e macrófagos em resposta às bactérias periodontais e componentes bacterianos e, como atua direcionando neutrófilos polimorfonucleares para o local da infecção, o recrutamento destas células resulta na produção de mais citocinas, contribuindo para a progressão da doença (Sahingur, Yeudall, 2015).

Já a interleucina 6 é considerada uma citocina pró-inflamatória em injúria aguda. Participa também da reabsorção óssea e do estabelecimento de inflamação crônica em doenças periodontais, tem implicação no controle da permeabilidade vascular e na produção de colágeno, resultando no recrutamento de células inflamatórias.

No estudo de Wu et al. (2015), os autores observaram que houve um aumento na expressão de IL-6 e IL-8 em hPDLF (células do ligamento periodontal humano) frente à estímulos de LPS, e que outras citocinas não foram igualmente susceptíveis à este estímulo. Nosso estudo mostrou resultados coerentes com o estudo de Wu et al. (2015) mostrando diferenças estatisticamente significantes na expressão de IL-6 e IL-8 quando os fibroblastos foram semeados sobre os discos de dentina tratados com as substâncias propostas. Os autores afirmam que níveis elevados de IL-6 e IL-8 em resposta a um estímulo patogênico representam uma situação de dano tecidual ou stress e contribuem para a resposta imune de fibroblastos. Quando comparada a expressão das citocinas entre os grupos, podemos observar que, apesar dos melhores resultados em termos de viabilidade e proliferação celular, o EDTA 17% causou maior resposta inflamatória com a produção de IL-6, onde diferiu estatisticamente dos grupos controle positivo e negativo, e com a expressão de IL-8 onde diferiu dos grupos colágeno, controle positivo e negativo. Observando-se somente a expressão da IL-8 podemos também concluir que o Emdogain[®] teve comportamento bem semelhante ao EDTA 17%.

Em nosso estudo a interleucina 1- β apresentou resultados de expressão através do teste de ELISA, porém não diferiu estatisticamente das demais citocinas. A IL-1 β é uma citocina com efeitos biológicos confirmados como a reabsorção óssea, febre e indução de síntese de prostaglandinas (Preshaw, Taylor, 2011). Assim como a IL-8, a IL-1 β é um mediador pró-inflamatório que exacerba a resposta inflamatória e promove a progressão para estágios mais avançados da doença, assim como causa a perda da rede de fibra de colágeno em torno do infiltrado inflamatório devido à ativação do sistema imune local, sendo que a sua importância na destruição das articulações parece resultar da sua capacidade de suprimir a síntese de colágeno tipo II e promover a síntese de colágeno de tipo I característico de fibroblastos (Lin et al., 2015; Sahingur,

Yeudall, 2015). Além disso, essa citocina medeia uma variedade de processos de defesa do hospedeiro, tais como a inflamação e resposta celular contra uma lesão (Lin et al., 2015). Na presença da IL-1 β , as células do ligamento periodontal são capazes de mudar suas características fenotípicas de forma transitória e passam a mediar processos catabólicos como a reabsorção óssea (Kanzaki et al., 2002).

A interleucina 10 e o TNF- α não mostraram níveis de expressão no presente estudo. A IL-10 é um polipeptídeo não glicosilado, com características anti-inflamatórias, sintetizado principalmente em células imunológicas e tecidos neuro-endócrino e neural (Oliveira et al., 2011). A sua expressão atuante principalmente nestes tipos celulares podem justificar a sua ausência no ensaio de ELISA. Se tivesse apresentado expressão no nosso estudo, provavelmente teria suprimido o aparecimento da IL-1 e IL-6 e ativado o aparecimento de outras citocinas anti-inflamatórias (Oliveira et al., 2011; Baek et al., 2013). O TNF- α , ou caquetina, também possui efeitos pleiotrópicos incluindo a ativação de leucócitos inflamatórios, modificação da permeabilidade vascular e indução da reabsorção óssea, além de estar presente em inflamações crônicas (Marinho et al., 2015). É uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por monócitos, macrófagos e linfócitos-T e pode estimular a produção de fibroblastos (Oliveira et al., 2011). Devido à sua capacidade de modificar eventos hemodinâmicos e de causar reabsorção óssea, esperávamos que essa citocina fosse expressa no estudo, porém a sua ausência pode ser explicada pela sua relação com outros tipos celulares que não o fibroblasto (Marinho et al., 2015).

Sendo assim, concordamos com Graves et al. (2008) e Oliveira et al. (2011), quando os autores dizem que, dadas as consequências profundas da liberação de citocinas de forma descontrolada, a regulamentação destas moléculas biologicamente ativas se faz essencial para o funcionamento das respostas imune e inflamatória, uma vez que a produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias a partir da lesão pode manifestar-se sistematicamente com instabilidade hemodinâmica ou distúrbios metabólicos.

7 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que:

- a) a ação do EDTA 17% por 5 minutos, sem agitação, é mais efetiva na adesão de fibroblastos do ligamento periodontal sob a superfície cementária, além de produzir menores efeitos citotóxicos sobre as mesmas;
- b) dentre as substâncias empregadas, o ácido hialurônico apresentou melhores resultados frente ao teste de citotoxicidade, se mostrando mais biocompatível com os fibroblastos do ligamento periodontal;
- c) quanto à resposta inflamatória, pode-se observar que houve a expressão da IL-1 β , IL-6 e IL-8, citocinas pró-inflamatórias.

8 REFERÊNCIAS*

Alves LB, Mariguela VC, Grisi MFM, Souza SLS, Novaes Júnior AB, Taba Júnior M, et al. Expression of osteoblastic phenotype in periodontal ligament fibroblasts cultured in three-dimensional collagen gel. *J Appl Oral Sci.* 2015 Mar-Apr;23(2):206-14. doi: 10.1590/1678-775720140462.

Andersson L, Andreasen JO, Day P, Heithersay G, Trope M, DiAngelis AJ, et al. International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2. Avulsion of permanent teeth *Dent Traumatol.* 2012 Apr;28:88–96. doi: 10.1111/j.1600-9657.2012.01125.x.

Andreasen JO. Effect of extra-alveolar period and storage media upon periodontal and pulpal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Int J Oral Surg.* 1981 Feb;10(1):43–53.

Baek KJ, Choi Y, Ji S. Gingival fibroblasts from periodontitis patients exhibit inflammatory characteristics in vitro. *Arch Oral Biol.* 2013 Oct;58(10):1282-92. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.07.007. Epub 2013 Aug 15.

Bansal J, Kedige SD, Anand S. Hyaluronic acid: a promising mediator for periodontal regeneration. *Indian J Dent Res.* 2010 Oct-Dec;21(4):575-8. doi: 10.4103/0970-9290.74232.

Barltrop JA, Owen TC, Cory AH, Cory JG. 5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulphophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorg Med Chem Lett.* 1991;1(11):611-4. doi: 10.1016/S0960-894X(01)81162-8.

Belibasakis GN, Thurnheer T, Bostanci N. Interleukin-8 responses of multi-layer gingival epithelia to subgingival biofilms: role of the “red complex” complex. *PLoS O.* 2013 Dec;8(12):e81581. doi: 10.1371/journal.pone.0081581.

Bolortuya G, Ebihara A, Ichinose S, Watanabe S, Anjo T, Kokuzawa C, et al. Effects of dentin surface modifications treated with Er:YAG and Nd:YAG laser irradiation on fibroblast cell adhesion. *Photomed Laser Surg.* 2012 Feb;30(2):63-70. doi: 10.1089/pho.2011.3132. Epub 2011 Nov 22.

Çalt S, Serper A. Time-dependent effects of edta od dentin structures. *J Endod.* 2002 Jan;28(1):17-9.

Camargo CHR, Siviero M, Camargo SEA, Oliveira SHG, Carvalho CAT, Valera MC. Topographical, diametral, and quantitative analysis of dentin tubules in the root canals of human and bovine teeth. *J Endod.* 2007 Apr;33(4):422-6.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jan 2016]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Carvalho Edos, Costa FTS, Campos MS, Anbinder AL, Neves ACC, Habitante SM, et al. Root surface treatment using diode laser in delayed tooth replantation: radiographic and histomorphometric analyses in rats. *Dent Traumatol.* 2012 Dec;28(6):429-36. doi: 10.1111/j.1600-9657.2011.01108.x

Chen FM, Jin Y. Periodontal tissue engineering and regeneration: current approaches and expanding opportunities. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010 Apr;16(2):219-55. doi: 10.1089/ten.TEB.2009.0562.

Cvikl B, Lussi A, Moritz A, Sculean A, Gruber R. Sterile-filtered saliva is a strong inducer of IL-6 and IL-8 in oral fibroblasts. *Clin Oral Invest.* 2015 Mar;19(2):385-99. doi: 10.1007/s00784-014-1232-3. Epub 2014 Mar 29.

Damé-Teixeira N, Alves LS, Susin C, Maltz M. Traumatic dental injury among 12-year-old South Brazilian schoolchildren: prevalence, severity, and risk indicators. *Dent Traumatol.* 2013 Feb;29 (1):52-8. doi: 10.1111/j.1600-9657.2012.01124.x

Diomedede F, Caputi S, Merciaro I, Frisone S, D'Arcangelo C, Piattelli A, et al. Pro-inflammatory cytokine release and cell growth inhibition in primary human oral cells after exposure to endodontic sealer. *Int Endod J.* 2014 Sep;47(9):864-72. doi: 10.1111/iej.12230.

Eick S, Renatus A, Heinicke M, Pfister W, Stratul S, Jentsch H. Hyaluronic acid as an adjunct after scaling and root planing: a prospective randomized clinical trial. *J Periodontol.* 2013 Jul;84(7):941-9. doi: 10.1902/jop.2012.120269.

Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP, Sarte P, Lau EC, Diekwisch T, et al. Self-assembly of a recombinant amelogenin protein generates supramolecular structures. *J Struct Biol.* 1994 Mar-Apr;112(2):103-9.

Gestrelius S, Andersson C, Johansson A, Persson E, Brondin A, Rydhag L, et al. Formulation of enamel matrix derivative for surface coating. Kinetics and cell colonization. *J Clin Periodontol.* 1997 Sep;24(9 Pt 2):678-84.

Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2008 Aug;79(8 Suppl):1585-91. doi: 10.1902/jop.2008.080183.

Gulinelli JL, Panzarini SR, Fattah CMRS, Poi WR, Sonoda CK, Negri MR, et al. Effect of root surface treatment with propolis and fluoride in delayed tooth replantation in rats. *Dent Traumatol.* 2008 Dec;651-7. doi: 10.1111/j.1600-9657.2008.00667.x.

Hakki SS, Korkusuz P, Berk G, Dundar N, Saglam M, Bozkurt B, et al. Comparison of Er,Cr:YSGG laser and hand instrumentation on the attachment of periodontal ligament fibroblasts to periodontally diseased root surfaces: an *in vitro* study. *J Periodontol.* 2010 Aug;81(8):1216-25. doi: 10.1902/jop.2010.090715.

He H, Yu J, Song Y, Lu S, Liu H, Liu L. Thermal and morphological effects of the pulsed Nd:YAG laser on root canal surfaces. *Photomed Laser Surg.* 2009 Apr;27(2):235-40. doi: 10.1089/pho.2008.2244.

Hoang AM, Klebe RJ, Steffensen B, Ryu OH, Simmer JP, Cochran DL. Amelogenin is a cell adhesion protein. *J Dent Res*. 2002 Jul;81(7):497-500.

Huang X, Zhang J, Huang C, Wang Y, Pei D. Effect of intracanal dentine wettability on human dental pulp cell attachment. *Int Endod J*. 2012 Apr;45(4):346-53. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01982.x. Epub 2011 Nov 9.

Horton JE, Raisz LG, Simmons HA, Oppenheim JJ, Mergenhagen SE. Bone resorbing activity in supernatant fluid from cultured human peripheral blood leukocytes. *Science*. 1972 Sep 1;177(4051):793-95.

Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol Rev*. 2011;91:221-64.

Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J Bone Miner Res*. 2002 Feb;17(2):210-20.

Ke Y, Wang YJ, Ren L, Zhao QC, Huang W. Modified PHBV scaffolds by in situ UV polymerization: structural characteristic mechanical properties and bone mesenchymal stem cell compatibility. *Acta Biomater*. 2010 Apr;6(4):1329-36. doi: 10.1016/j.actbio.2009.10.026. Epub 2009 Oct 21.

Kishida M, Sato S, Ito K. Comparison of the effects of various periodontal rotary instruments on surface characteristics of root surface. *J Oral Sci*. 2004 Mar;46(1):1-8.

Kraychete DC, Calasans MTA, Valente CML. Citocinas pró-inflamatórias e dor. *Rev Bras Reumatol*. 2006;46(3):199-206.

Kuijpers AJ, Engbers GH, Krijgsveld J, Zaat SA, Dankert J, Feijen J. Cross-linking and characterisation of gelatin matrices for biomedical applications. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2000;11(3):225-43.

Kumar R, Bumb RA, Salotra P. Evaluation of localized and systemic immune responses in cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica*: interleukin-8, monocyte chemotactic protein-1 and nitric oxide are major regulatory factors. *Immunology*. 2010 Jun;130(2):193-201.

Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004 Feb;15(1):49-60.

Lin X, Kong J, Wu Q, Yang Y, Ji P. Effect of TLR4/MyD88 signaling pathway on expression of IL-1 β and TNF- α in synovial fibroblasts from temporomandibular joint exposed to lipopolysaccharide. *Hindawi*. 2015;1-11.

Lindskog S, Blomlöf L, Hammarström L. Repair of periodontal tissues in vivo and in vitro. *J Clin Periodontol* 1983 Mar;10(2):188–205.

Lindskog S, Hammarström L. Evidence in favor of an antiinvasion factor in cementum or periodontal membrane of human teeth. *Scand J Dent Res* 1980 Apr;88(2):161–3.

Liu J, Tang X, Li C, Pan C, Li Q, Geng F, et al. *Porphyromonas gingivalis* promotes the cell cycle and inflammatory cytokine production in periodontal ligament fibroblasts. *Arch Oral Biol*. 2015 Aug;60(8):1153-61. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.05.004. Epub 2015 May 21.

Lyngstadaas SP, Lundberg E, Ekdahl H, Andersson C, Gestrelus S. Autocrine growth factors in human periodontal ligament cells cultured on enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol*. 2001 Feb;28(2):181-8.

Lopes HP, Siqueira Jr JF. *Endodontia: biologia e técnica*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.

Manfrin TM, Poi WR, Okamoto R, Panzarini SR, Sonoda CK, Saito CT, et al. Expression of OPG, RANK and RANKL proteins in tooth repair processes after immediate and delayed tooth. *J Craniofac Surg*. 2013 Jan;24(1):e74-80. doi: 10.1097/SCS.0b013e318270fbf6.

Marinho ACS, Martinho FC, Leite FRM, Nascimento GG, Gomes BPFA. Proinflammatory activity of primarily infected endodontic content against macrophages after different phases of root canal therapy. *J Endod*. 2015 Jun;41(6):817-23. doi: 10.1016/j.joen.2015.01.017. Epub 2015 Mar 11.

Mellonig JT. Enamel matrix derivative for periodontal reconstructive surgery: technique and clinical and histologic case report. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1999 Feb;19(1):8–19.

Moazami F, Mirhadi H, Geramizadeh B, Sahebi S. Comparison of soymilk, powdered milk, Hank's balanced salt solution and tap water on periodontal ligament cell survival. *Dent Traumatol*. 2012 Apr;28(2):132-5. doi: 10.1111/j.1600-9657.2011.01054.x. Epub 2011 Sep 5.

Mori GC, Moraes IG, Garcia RB, Borro LCB, Purificação BR. Microscopic investigation of gallium nitrate for root surface treatment in rat teeth submitted to delayed replantation. *Braz Dent J*. 2007;18(3):198-201. Epub 2012 Mar 20.

Mori GG, Poi WR, Castilho LR. Evaluation of the anti-resorptive ability of an experimental acetazolamide paste for the treatment of late replanted teeth: a study in rats. *Dent Traumatol*. 2013 Feb;29(1):34-40. doi: 10.1111/j.1600-9657.2012.01131.x.

Nasser MW, Raghuwanshi SK, Grant DJ, Jala VR, Rajarathnam K, Richardson RM. Differential activation and regulation of CXCR1 and CXCR2 by CXCL8

monomer and dimer. *J Immunol.* 2009 Sep 1;183(5):3425–32. doi: 10.4049/jimmunol.0900305. Epub 2009 Aug 10.

Nishikawa M, Yamaguchi Y, Yoshitake K, Saeki Y. Effects of TNF α and prostaglandin E2 on the expression of MMPs in human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol Res.* 2002 Jun;37(3):167-76

Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Citocinas e Dor. *Rev Bras Anesthesiol.* 2011;61(2):255-65.

Oliveira GJPL, Theodoro LH, Marcantonio Junior E, Sampaio JEC, Marcantonio RAC. Effect of Er,Cr:YSGG and Er:YAG laser irradiation on the adhesion of blood components and on root morphology. *Braz Oral Res.* 2012 May-Jun;26(3):256-62.

Padial-Molina M, Volk SL, Taut AD, Giannobile WV, Rios HF. Periostin is down-regulated during periodontal inflammation. *J Dent Res.* 2012 Nov;91 (11):1078-84. doi: 10.1177/0022034512459655. Epub 2012 Aug 29.

Palaiologou AA, Yukna RA, Moses R, Lallier TE. Gingival, dermal, and periodontal ligament fibroblasts express diferente extracelular matrix receptors. *J Periodontol.* 2001 Jun;72(6):798-807.

Pang NS, Lee SJ, Kim E, Shin DM, Cho SW, Park W, et al. Effect of EDTA on attachment and differentiation od dental pulp stem cells. *J Endod.* 2014 Jun;40(6):811-7. doi: 10.1016/j.joen.2013.09.007. Epub 2013 Oct 13.

Panzarini SR, Carvalho ACP, Poi WR, Sonoda CK. Use of vitamin C in delayed tooth replantation. *Braz Dent J.* 2005;16(1):17-22.

Panzarini SR, Okamoto R, Poi WR, Sonoda CK, Pedrini D, Silva PE, et al. Histological and immunohistochemical analyses of the chronology of healing process after immediate tooth replantation in incisor rat teeth. *Dent Traumatol.* 2013 Feb;29(1):15-22. doi: 10.1111/j.1600-9657.2012.01127.x. Epub 2012 Mar 13.

Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2011 Mar;38 Suppl 11:60-84. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01671.x.

Poi WR, Carvalho RM, Panzarini SR, Sonoda CK, Manfrin TM, Rodrigues TS. Influence of enamel matrix derivative (Emdogain[®]) and sodium fluoride on the healing process in delayed tooth replantation: histologic and histometric analysis in rats. *Dent Traumatol.* 2007 Feb;23(1):35-41; doi: 10.1111/j.1600-9657.2006.00481.x

Pontoriero R, Wennström J, Lindhe J. The use of barrier membranes and enamel matrix proteins in the treatment of angular bone defects. A prospective controlled clinical study. *J Clin Periodontol*. 1999 Dec;26(12):833–40.

Roberts-Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol*. 2000 Nov;45(11):1013-6.

Rungsiyanont S, Dhanesuan N, Swasdison S, Kasugai S. Evaluation of biomimetic scaffold of gelatin-hydroxyapatite crosslink as a novel scaffold of tissue engineering: biocompatibility evaluation with human PDL fibroblasts, human mesenchymal stromal cells, and primary bone cells. *J Biomater Appl*. 2012 Jul;27(1):47-54. doi: 10.1177/0885328210391920. Epub 2011 Feb 22.

Saito CTMH, Gulinelli JL, Panzarini SR, Garcia VG, Okamoto R, Okamoto T, et al. Effect of low-level laser therapy on the healing process after tooth replantation: a histomorphometrical and immunohistochemical analysis. *Dent Traumatol*. 2011 Feb;27(1):30-9. doi: 10.1111/j.1600-9657.2010.00946.x

Sahingur SE, Yeudall WA. Chemokine function in periodontal disease and oral cavity cancer. *Front Immunol*. 2015 May;6:214. doi: 10.3389/fimmu.2015.00214

Scelza MZ, Linhares AB, da Silva LE, Granjeiro JM, Alves GG. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. *Int Endod J*. 2012 Jan;45(1):12-8. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01941.x. Epub 2011 Sep 8.

Schwarz F, Aoki A, Sculean A, Becker J. The impact of laser application on periodontal and peri-implant wound healing. *Periodontol* 2000. 2009;51:79-108. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00301.x.

Shibata M, Shintaku Y, Matsuzaki K, Uematsu S. The effect of IL-17 on the production of proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinase-1 by human periodontal ligament fibroblasts. *Orthod Craniofac Res*. 2014 Feb;17(1):60-8; doi: 10.1111/ocr.12033.

Takeda K, Sakai N, Shiba H, Nagahara T, Fujita T, Kajiya M, et al. Characteristics of high-molecular-weight hyaluronic acid as a brain-derived neutrophilic factor scaffold in periodontal tissue regeneration. *Tissue Eng Part A*. 2011 Apr;17(7-8):955-67. doi: 10.1089/ten.TEA.2010.0070.

Trevino EG, Patwardhan AN, Henry MA, Perry G, Dybdal-Hargreaves N, Hargreaves KM, et al. Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. *J Endod*. 2011 Aug;37(8):1109-15. doi: 10.1016/j.joen.2011.05.013.

Trevisan CL, Panzarini SR, Brandini DA, Poi WR, Luvizuto ER, Dos Santos CLV, et al. Calcium hydroxide mixed with camphoric p-monochlorophenol or chlorhexidine in delayed tooth replantation. *J Craniofac Surg*. 2011 Nov;22(6):2097-101. doi: 10.1097/SCS.0b013e3182326de4.

Trope M. Avulsion of permanent teeth: theory to practice. *Dent Traumatol.* 2011 Aug;27(4):281-94. doi: 10.1111/j.1600-9657.2011.01003.x.

Wang Y, Cheung GS, Xu X, Zhao S, Zhang C. The effect of cultured autologous periodontal ligament cells on the healing of delayed autotransplanted dog's teeth. *J Endod.* 2010 Feb;36(2):264-7. Doi: 10.1016/j.joen.2009.09.014. Epub 2009 Oct 27.

Woodard JR, Hilldore AJ, Lan SK, et al. The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials.* 2007 Jan;28(1):45–54.

Wu X, Zhang G, Wang X, Zhang P, Tan Y. Endotoxin tolerance induction in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with different bacterial lipopolysaccharides. *Arch Oral Biol.* 2015;60(3):463-70. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.10.005.

Yang X, Han G, Pang X, Fan M. Chitosan/collagen scaffold containing bone morphogenetic protein-7 DNA supports dental pulp stem cell differentiation *in vitro* and *in vivo*. *J Biomed Mater Res Part A.* 2012 Feb 18. doi: 10.1002/jbm.a.34064.

Yucel-Lindberg T, Båge T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Rev Mol Med.* 2013 Aug 5;15:e7. doi: 10.1017/erm.2013.8.

Zandi M, Mirzadeh H, Mayer C, et al. Biocompatibility evaluation of nano-rod hydroxyapatite/gelatin coated with nano-HAp as a novel scaffold using mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A.* 2010 Mar 15;92(4):1244–55. doi: 10.1002/jbm.a.32452.

Zhou Y, Li Y, Mao L, Peng H. Periodontal healing by periodontal ligament cell sheets in a teeth replantation model. *Arch Oral Biol.* 2012 Feb;57(2):169-76. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.08.008. Epub 2011 Sep 9.

APÊNDICE A – Citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias

Quadro 4 – Citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.

Citocina	Ação	Produção Celular	Atividade
IL-1 β	Pró-inflamatória	Macrófagos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais	Inflamação sistêmica, ativação da COX-2 e PGE ₂ (febre). Mantem a dor pós-operatória
IL-6	Pró-inflamatória	Macrófagos, monócitos, eosinófilos, hepatócitos e da glia	Causa febre, induz e controla a síntese e liberação de proteínas da fase aguda pelos hepatócitos e promove a maturação e ativação de neutrófilos, macrófagos e linfócitos-T
IL-8	Pró-inflamatória	Macrófagos, células epiteliais e células endoteliais, fibroblastos, queratinócitos, melanócitos, hepatócitos e condrócitos	Quimiotaxia para neutrófilos, promotor da angiogênese,
IL-10	Anti-inflamatória	Células imunológicas e tecidos neuro-endócrino e neural	Inibe citocinas pró-inflamatórias e estimula a produção endógena de citocinas anti-inflamatórias. Também possui efeito supressivo
TNF- α	Pró-inflamatória	Monócitos, macrófagos, linfócitos-T, neurônios e células da glia	Hiperalgisia inflamatória e neuropática, estimula a proliferação de linfócitos-T, fibroblastos e células matadoras naturais

(Kraychete et al., 2006; Kumar et al., 2010; Oliveira et al., 2011).

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA CAMPUS SÃO JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP</p> </div> <div style="text-align: right;">  </div> </div>								
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP								
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA								
Título da Pesquisa: INFLUÊNCIA DE DIFERENTES TRATAMENTOS FÍSICO-QUÍMICOS NA ADESÃO DE FIBROBLASTOS DE LIGAMENTO PERIODONTAL À SUPERFÍCIE RADICULAR DE DENTES AVULSIONADOS								
Pesquisador: Camilla Saíd Moreira								
Área Temática:								
Versão: 1								
CAAE: 20289213.1.0000.0077								
Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP								
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio								
DADOS DO PARECER								
Número do Parecer: 367.966								
Data da Relatoria: 13/08/2013								
Apresentação do Projeto: O projeto está bem apresentado.								
Objetivo da Pesquisa: O projeto tem por objetivo verificar a viabilidade de fibroblastos de ligamento periodontal plaqueados sobre discos radiculares (teste XTT), além da expressão gênica da fibronectina através de RT-PCR e sua quantificação pelo teste ELISA e, em caráter ilustrativo, observar em microscopia eletrônica de varredura a adesão dos fibroblastos à superfície de discos radiculares, após o tratamento dos mesmos com EDTA 17%, fluoreto estanhoso a 2% e exposição ao laser Nd:YAG associado à hidroxiapatita nanoparticulada sob diferentes protocolos.								
Avaliação dos Riscos e Benefícios: Não apresenta riscos e os benefícios seriam a possibilidade de aplicar, futuramente, os mesmos protocolos em casos de avulsão dentária, melhorando a adesão das células do ligamento periodontal à superfície radicular.								
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: A pesquisa tem potencial de melhorar as condições em casos de avulsão dentária em futuro próximo.								
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td colspan="2">Endereço: Av Engº Francisco José Longo 777</td> </tr> <tr> <td>Bairro: Jardim São Dimas</td> <td>CEP: 12.245-000</td> </tr> <tr> <td>UF: SP</td> <td>Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS</td> </tr> <tr> <td>Telefone: (12)3947-9075</td> <td>Fax: (12)3947-9010 E-mail: cep@focj.unesp.br</td> </tr> </table>	Endereço: Av Engº Francisco José Longo 777		Bairro: Jardim São Dimas	CEP: 12.245-000	UF: SP	Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS	Telefone: (12)3947-9075	Fax: (12)3947-9010 E-mail: cep@focj.unesp.br
Endereço: Av Engº Francisco José Longo 777								
Bairro: Jardim São Dimas	CEP: 12.245-000							
UF: SP	Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS							
Telefone: (12)3947-9075	Fax: (12)3947-9010 E-mail: cep@focj.unesp.br							
Página 01 de 02								