LUANA MAROTTA REIS

INFLUÊNCIA DO GEL DE EDTA A 24% NO TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS: análise histológica.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Concentração em Biopatologia Bucal.

LUANA MAROTTA REIS

INFLUÊNCIA DO GEL DE EDTA A 24% NO TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS: análise histológica.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos par a obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Concentração em Biopatologia Bucal.

Orientadora Prof[a]. Adjunta Yasmin Rodarte Carvalho

São José dos Campos
2002

Meus amados pais,

José Everaldo Reis

Luzia Paula Marotta Reis

À vocês que são a origem de tudo, toda minha gratidão e ternura!

Dedico-lhes este trabalho, com a mais profunda admiração e respeito.

À estimada mestra **Prof[a] Adjunta Yasmin Rodarte Carvalho** pelo convívio tão agradável e enriquecedor e pelo grande exemplo de competência e dignidade.

Meus sinceros agradecimentos!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Às minhas amadas irmãs **Janainna e Tarsila**, que sempre estiveram ao meu lado e me proporcionam uma família linda e maravilhosa.

Ao meu adorado **Gustavo**, pela compreensão e paciência em todos os momentos.

À **Natália** e ao **Murilo**, que apesar de serem tão pequeninos são tão importantes na minha vida e me dão tanta alegria.

Aos amigos **Raquel, Carol, Liana e Dalton**, pelo companheirismo e estímulo durante esta jornada.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa da Diretora da Faculdade de odontologia de São José dos Campos, **Profª Titular Maria Amélia Máximo de Araújo**, pela oportunidade desta formação científica.

Aos **docentes** do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, pela colaboração e ensinamentos transmitidos.

Ao **Prof. Ivan Balducci**, pela elaboração da análise estatística e gráficos dos resultados da pesquisa.

Ao **Prof. Luiz Eduardo Blumer Rosa**, pelo interesse, opiniões e amizade.

À **Profª Lucilene Hernandes Ricardo** por toda atenção, disponibilidade e contribuição em todos os momentos.

Aos funcionários do Biotério **Lourival Jacobs e Antônio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcelos**, pela colaboração na fase experimental deste trabalho e pela paciência.

Aos **colegas** do curso de Pós-Graduação pela convivência alegre e enriquecedora.

Às técnicas do Laboratório de Apoio à Pesquisa **Maria Salete Faria e Mônica de Oliveira Guimarães Figueiredo** e do Laboratório do Departamento de Biociências e Diagnóstico **Ana Lourdes da Silva Machado**, pelo tempo e cuidado dispensado ao material deste estudo.

À **Terezinha de Fátima Arantes de Melo e Sílvia Scarpel** pela ajuda e atenção em todos os momentos.

Ao **Prof. Décio Pinto Júnior** por ter nos auxiliado na obtenção das fotografias deste trabalho.

À minha madrinha **Nazareth Aparecida Reis Grillo**, pela atenção e correção da Língua Portuguesa.

Às **funcionárias da biblioteca** desta Faculdade pela disponibilidade e auxílio em todas as dúvidas.

Às secretárias da Pós-Graduação, **Rosemary de Fátima Salgado, Erena Michie Hasegawa e Maria Aparecida Consiglio** pela orientação e auxílio nesta jornada.

À bibliotecária **Ângela de Brito Bellini**, pela revisão deste estudo.

A **CAPES** pela concessão de bolsa de estudo durante este trabalho.

Ao **Fausto Villas-Bôas** pelo auxilio na correção do *abstract*.

Aos **animais experimentais**, meu profundo respeito.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS..... 9

LISTA DE TABELAS..... 11

LISTA DE QUADROS..... 13

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS..... 14

RESUMO..... 16

1 INTRODUÇÃO..... 17

2 REVISÃO DA LITERATURA..... 19

2.1 Regeneração periodontal 24

2.2 A superfície radicular 30

2.3 Desmineralização da superfície radicular 35

3 PROPOSIÇÃO 60

4 MATERIAL E MÉTODOS 61

4.1 Animais experimentais 61

4.2 Metodologia 62

4.2.1 Indução da doença periodontal 62

4.2.2 Tratamento e tempo de sacrifício..... 63

4.3 Análise Histológica 66

4.4 Análise Histomorfométrica 67

4.5 Análise Estatística 68

5 RESULTADOS 69

5.1 Análise Histológica 69

5.1.1 Período de 4 dias 71

5.1.2 Período de 10 dias 75

5.1.3 Período de 28 dias 77

5.2 Análise Estatística 80

5.2.1 Epitélio 80

5.2.2 Tecido conjuntivo inflamado 83

5.2.3 Tecido conjuntivo sadio..... 86

5.2.4 Preenchimento total da área..... 89

6 DISCUSSÃO 93

7 CONCLUSÃO 105

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 106

ANEXO..... 116

APÊNDICE..... 117

ABSTRACT 121

LISTA DE FIGURAS

FIGURA1 - **Metodologia**: a) inserção da ligadura ao redor do 2° molar superior; b) ligadura em posição para início da indução da doença periodontal; c) 5 semanas após a inserção da ligadura – indução da doença periodontal; d) raspagem e aplainamento radicular; e) marcação na região mais profunda da bolsa; f) condicionamento ácido da superfície radicular..... 65

FIGURA 2 - **Período de 4 dias**: a) EDTA: marcação na superfície radicular (→) e epitélio preenchendo a marcação (★). Tricrômico de Masson, aumento original de 25X; b) EDTA: reabsorção óssea (→) e ninho epitelial (►) na região de furca. HE, aumento original de 25X; c) placebo: epitélio proliferando apicalmente à marcação (→) e dentina reparadora (★). HE, aumento original de 100X..... 73

FIGURA 3 - **Período de 4 dias**: a) EDTA: marcação na superfície radicular (→), projeção do epitélio ultrapassando a marcação (►). HE, aumento original 25X; b) controle: epitélio proliferando até o terço médio da marcação (→), rede de fibrina (★). HE, aumento original 100X; c) placebo: epitélio proliferando na região da marcação (→), fibrina e tecido conjuntivo desorganizado apicalmente à marcação (★). HE, aumento original 100X; d) controle: degeneração das células superficiais do epitélio (→), pêlo (►). HE, aumento original 100X..... 74

FIGURA 4 - **Período de 10 dias**: a) EDTA: marcação na superfície radicular (→) e placa bacteriana (►). HE, aumento original de 25X; b) EDTA: projeção epitelial fina e alongada ultrapassando a marcação. HE, aumento original de 100X. c) EDTA: projeções epiteliais mais espessas e em maior número ultrapassando a marcação (→) e infiltrado inflamatório subepitelial. HE, aumento original de 100X; d) placebo: proliferação epitelial até o terço médio da marcação (→), tecido conjuntivo altamente celularizado e infiltrado inflamatório subepitelial. HE, aumento original de 100X..... 76

FIGURA 5 - **Período de 28 dias**: a) EDTA: marcação na superfície radicular (→), epitélio (►). HE, aumento original de 25X. b) projeção epitelial (→): detalhe da figura anterior. HE, aumento original de 100X..... 78

FIGURA 6 - **Período de 28 dias**: a) placebo: marcação na superfície radicular (→), epitélio (➔) e pêlo (►). HE, aumento original de 25X. b) epitélio proliferando apicalmente à marcação (➔): detalhe da figura anterior. HE, aumento original de 100X. c) controle: epitélio proliferando apicalmente à marcação (➔) e pêlo (►). HE, aumento original de 100X. d) placebo: tendência de orientação paralela dos fibroblastos (→). HE, aumento original de 100X..... 79

FIGURA 7 - Gráfico de médias de preenchimento da marcação (%) por epitélio referente à interação entre tratamento e tempo de sacrifício 83

FIGURA 8 - Gráfico de médias de preenchimento da marcação (%) por tecido conjuntivo inflamado referente à interação entre tratamento e tempo de sacrifício 85

FIGURA 9 - Gráfico de médias de preenchimento da marcação (%) por tecido conjuntivo sadio referente à interação entre tratamento e tempo de sacrifício 89

FIGURA 10 - Gráfico de médias do preenchimento total da marcação (%) considerando à interação entre tratamento e tempo de sacrifício 92

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Estatística descritiva dos dados referentes ao preenchimento da marcação (%) por epitélio em relação a variável tratamento 81

TABELA 2 - Estatística descritiva dos dados referentes ao preenchimento da marcação (%) por epitélio em relação ao tempo de sacrifício 81

TABELA 3 - Estatística descritiva dos dados referentes ao preenchimento da marcação (%) por epitélio em relação a interação entre tratamento e tempo de sacrifício 81

TABELA 4 - Resultados da ANOVA, referente aos dados de preenchimento da área da marcação por epitélio 82

TABELA 5 - Representação em ordem decrescente de médias de preenchimento da marcação por epitélio, que diferem significativamente, em relação à variável tempo de sacrifício, pelo Teste de Tukey (5%) 82

TABELA 6 - Estatística descritiva dos dados referentes ao preenchimento da marcação (%) por tecido conjuntivo inflamado em relação a variável tratamento 84

TABELA 7 - Estatística descritiva dos dados referentes ao preenchimento da marcação (%) por tecido conjuntivo inflamado em relação ao tempo de sacrifício 84

TABELA 8 - Estatística descritiva dos dados referentes ao preenchimento da marcação (%) por tecido conjuntivo inflamado em relação a interação entre tratamento e tempo de sacrifício 84

TABELA 9 - Resultados da ANOVA, referente aos dados de preenchimento da área da marcação por tecido conjuntivo inflamado 85

TABELA 10 - Estatística descritiva dos dados referentes ao preenchimento da marcação (%) por tecido conjuntivo sadio em relação a variável tratamento 86

TABELA 11 - Estatística descritiva dos dados referentes ao preenchimento da marcação (%) por tecido conjuntivo sadio em relação ao tempo de sacrifício 86

TABELA 12 - Estatística descritiva dos dados referentes ao preenchimento da marcação (%) por tecido conjuntivo sadio em relação a interação entre tratamento e tempo de sacrifício 87
TABELA 13 - Resultados da ANOVA, referente aos dados de preenchimento da área da marcação por tecido conjuntivo sadio 87
TABELA 14 - Representação em ordem decrescente de médias de preenchimento da marcação por tecido conjuntivo sadio que diferem significativamente, em relação à variável tempo de sacrifício, pelo Teste de Tukey (5%) 88
TABELA 15 - Representação em ordem decrescente de médias de preenchimento da marcação por tecido conjuntivo sadio que diferem significativamente, em relação à variável interação entre tratamento e tempo de sacrifício, pelo Teste de Tukey (5%) 88
TABELA 16 - Estatística descritiva dos dados referentes ao preenchimento total da marcação (%) relação a variável tratamento 90
TABELA 17 - Estatística descritiva dos dados referentes ao preenchimento total da marcação (%) em relação ao tempo de sacrifício 90
TABELA 18 - Estatística descritiva dos dados referentes ao preenchimento total da marcação (%) em relação a interação entre tratamento e tempo de sacrifício 90
TABELA 19 - Resultados da ANOVA, referente aos dados de preenchimento total da área da marcação 91
TABELA 20 - Representação em ordem decrescente de médias de preenchimento total da marcação que diferem significativamente, em relação à variável interação entre tratamento e tempo de sacrifício, pelo Teste de Tukey (5%)..... 91

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Estudos *in vivo* com EDTA 55

QUADRO 2 - Estudos *in vitro* com EDTA 56

QUADRO 3 - Estudos comparativos *in vivo* utilizando o EDTA..... 57

QUADRO 4 - Estudos comparativos *in vitro* utilizando o EDTA 58

QUADRO 5 - Divisão dos grupos experimentais 64

LISTA DE ABREVIATURAS

AC – ácido cítrico
BMP – Proteína morfogenética
C – grupo controle
Ca – cálcio
Cir – cirurgia
COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CPC – cloreto de cetilpiridino
Dt – dente
DP – doença periodontal
E – grupo EDTA
EDTA – etileno diamino tetracetato
HCl-TTC – hidrocloreto de tetraciclina
Hipocl – hipoclorito de sódio
LDL – lactato- desidrogenase
LPS – lipopolissacarídeo
MEV – Microscópio eletrônico de varredura
Min – minuto
Mg – magnésio
Osteot – osteotomia
P – fósforo
P – grupo placebo
Rasp – raspagem
RDO – composição de ácidos, formaldeído, agentes umectantes e outras substâncias desconhecidas.

RNAms – ácido ribonucleico mensageiro

RTG – Regeneração tecidual guiada

Seg – segundo

SL – *smear layer*

SLS – lauril sulfato de sódio

Sol – solução

UNESP – Universidade Estadual Paulista

2°MSE – segundo molar superior esquerdo

REIS, L.M. **Influência do gel de EDTA a 24% no tratamento da doença periodontal induzida em ratos:** análise histológica. 2002. 121f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar se o gel de EDTA a 24%, (pH 7,0) apresenta efeito adjuvante ao tratamento periodontal não cirúrgico em periodontite induzida em ratos. Foram utilizados quarenta e cinco ratos machos, nos quais foi induzida a doença periodontal no 2° molar superior esquerdo por meio da inserção de ligadura de fio de algodão. Após 5 semanas, a ligadura foi removida e os animais submetidos à raspagem e aplainamento radicular. Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos: grupo EDTA (E), controle (C) e placebo (P); o grupo E foi condicionado com gel de EDTA a 24%, pH 7,0 durante 2 minutos, os animais do grupo C receberam apenas o tratamento mecânico e o grupo P foi condicionado com gel placebo, pH 7,0 durante 2 minutos. Todos os grupos foram irrigados com cloreto de sódio a 0,9% por 1 minuto. Em seguida, foi realizada marcação radicular na porção mais profunda da bolsa. Os animais foram sacrificados nos períodos de 4, 10 e 28 dias depois do tratamento. Os fragmentos da maxila contendo os molares foram submetidos à análise histológica e histomorfométrica para avaliação do grau de preenchimento e do tipo de tecido presente na região da marcação. As médias obtidas foram avaliadas pelo teste estatístico ANOVA e Teste de Tukey ao nível de significância $p < 0,05$. Os resultados mostraram que quanto ao tratamento realizado, não houve diferença estatisticamente significante com relação à reparação do periodonto. No entanto, o maior intervalo entre tratamento e tempo de sacrifício melhorou o reparo tecidual, uma vez que os animais sacrificados no período de 28 dias apresentaram menor quantidade de epitélio, maior quantidade de tecido conjuntivo sadio e preenchimento total da marcação. Foi verificada também ausência de tecido conjuntivo inflamado neste período. Concluiu-se que o gel de EDTA a 24%, pH 7,0 não contribuiu para o reparo do tecido periodontal, quando utilizado em associação ao tratamento periodontal não cirúrgico.

PALAVRAS-CHAVE: Raspagem e aplainamento radicular; EDTA; condicionamento radicular; análise histomorfométrica.

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal é a maior responsável pela destruição dos tecidos periodontais de suporte, sendo assim, seu tratamento tem como um dos principais objetivos obter o restabelecimento dos tecidos perdidos. A regeneração periodontal, definida como a nova formação de osso, cemento e ligamento periodontal, é o resultado final mais esperado, porém, não o mais obtido. Para se regenerar, o periodonto depende do tipo celular que irá colonizar a superfície radicular previamente doente, e, na maioria dos casos, o epitélio prolifera mais rapidamente, originando a reparação periodontal por meio do epitélio juncional longo.

Para sanar este problema, pesquisadores desenvolveram a técnica de regeneração tecidual guiada, que se baseia na seleção das células que repovoarão a superfície radicular. Além deste aspecto, a superfície radicular também tem importante papel no processo de regeneração periodontal, uma vez que pode servir como suporte para o depósito de bactérias e endotoxinas ou apresentar áreas hipermineralizadas, tornando-se incompatível com as células adjacentes ao periodonto. É preconizado, portanto, que a superfície a ser recolonizada por células do conjuntivo se encontre livre de cálculo, placa bacteriana e *smear layer*, camada formada por debris e restos orgânicos após a instrumentação periodontal.

Assim, a descontaminação ou desintoxicação da superfície radicular por substâncias ácidas como o ácido cítrico, ácido fosfórico, EDTA ou tetraciclina tem sido alvo de diversos estudos. Os condicionadores ácidos dissolveriam a *smear layer* e seriam capazes de

remover a porção mineralizada da superfície radicular, expondo fibras colágenas. Contudo, esta ação depende do tempo, modo de aplicação e tipo de agente aplicado, sendo encontrados resultados contraditórios em relação à eficácia do gel em promover nova inserção e sobre sua capacidade de produzir necrose nos tecidos circunjacentes.

O objetivo deste estudo é avaliar se o gel de EDTA a 24%, pH 7,0, aplicado durante 2 minutos associado a procedimento periodontal não cirúrgico é efetivo para a obtenção de nova inserção.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Define-se como periodonto os tecidos que apóiam e envolvem o dente, os quais consistem no cemento, no ligamento periodontal, no osso que *reveste* o alvéolo e na gengiva que se encontra em contato com o dentes (Ten Cate[79], 2001). É o único órgão composto por 4 diferentes tipos de tecidos, que variam quanto a sua composição celular, tipos e quantidade de proteínas, mineralização, grau de atividade metabólica e susceptibilidade à doença (Mariotti[48], 1993). O periodonto, portanto, interliga o dente ao osso dos maxilares e é responsável pelo seu suporte durante a função, sendo constituído por tecido conjuntivo, protegido por epitélio pavimentoso estratificado, queratinizado na superfície mastigatória e por epitélio não-queratinizado nas superfícies juncional e do sulco (Melcher[51], 1976).

Os processos inflamatórios e imunológicos que ocorrem nos tecidos periodontais funcionam como proteção contra o ataque microbiano, *simulando* uma barreira para impedir que os microrganismos se disseminem ou invadam os tecidos. Estes processos representam as características predominantes da gengivite e da periodontite – doenças que acometem o periodonto. A reação inflamatória pode ser visível, microscópica e/ou clinicamente, representando a reação do hospedeiro à microbiota da placa e seus produtos. Portanto, os processos inflamatórios e imunológicos são mecanismos de defesa do hospedeiro, que em alguns casos podem ser prejudiciais, pois são capazes de danificar ou destruir células e estruturas vizinhas do tecido conjuntivo, além do osso alveolar. Tais reações não são desencadeadas em resposta a uma simples espécie bacteriana, mas a uma infecção bacteriana mista. Como

resultado da doença periodontal teremos a perda do osso alveolar, dano às fibras do ligamento periodontal e migração apical do epitélio juncional a partir da junção esmalte-cemento (Lindhe et al.[42], 1999).

O tratamento periodontal pode resultar em ganho de altura do osso alveolar ao exame radiográfico ou ganho de inserção clínica, quando se realiza a sondagem periodontal. Porém, estas técnicas de avaliação clínica não demonstram a formação de novo cemento e novo ligamento periodontal nas superfícies das raízes doentes. Consequentemente, modelos animais que permitam a análise histológica são necessários para demonstrar a eficácia da terapia aplicada (Polson[58], 1986).

De maneira geral, os ratos possuem o epitélio gengival similar com o homem. Esta similaridade foi observada por Listgarten[45] (1975), ao estudar o periodonto de molares de ratos. A margem gengival dos humanos é relativamente pouco queratinizada quando comparada ao seu epitélio oral, porém, nos ratos esta margem parece ter um grau excepcional de queratinização. Enquanto o epitélio do sulco do homem não é queratinizado, este epitélio no rato é bem queratinizado, sendo do tipo estratificado pavimentoso, queratinizado, correspondendo ao epitélio oral dos humanos. Portanto, a grande diferença entre o epitélio do homem e do rato, é o grau de queratinização das áreas epiteliais, pois os ratos possuem o epitélio do sulco mais queratinizado que o epitélio oral, relação inversa a do homem.

Baseados na hipótese de que modelos animais são capazes de reproduzir a doença periodontal, Lindhe & Ericsson[41] (1978) estudaram a indução da doença por meio da inserção de ligadura de fio de algodão em dez cães. Alguns dentes permaneceram com a ligadura por 180 dias e outros por 360 dias. Os resultados demonstraram que a inserção da ligadura promoveu não apenas o desenvolvimento da gengivite como também a rápida destruição dos tecidos periodontais de

suporte, desempenhando, portanto, um papel importante no avanço da periodontite.

Bogle et al.[22] (1981), avaliaram se a terapia de raspagem radicular, associada ao condicionamento com ácido cítrico, resultaria em nova inserção em defeitos de furca classe III ocorridos naturalmente em cães Beagle, como se observa nos estudos em que a doença é induzida. Os resultados apresentados demonstraram que houve mais sucesso em relação ao ganho de nova inserção nos sítios em que a doença foi induzida, isto provavelmente é devido à longa duração da doença periodontal, quando o processo ocorre naturalmente.

Outros aspectos da doença periodontal para se avaliar nos modelos animais são o microbiológico e o imunológico. Klausen[38] (1991), avaliou o rato como modelo animal para estudos que envolviam patogenicidade microbiana e resposta imune do hospedeiro. Quanto ao aspecto estrutural do periodonto e desenvolvimento da doença periodontal, o rato demonstrou grande semelhança com o homem. O autor ressalta porém, que existem fatores a serem observados no início do estudo, como a idade dos animais que deve ser a mesma, nenhum animal deve ter infecção periodontal presente e não devem haver animais imunodeprimidos. Experimentos em ratos confirmam a patogenicidade dos microorganismos responsáveis pela doença periodontal em humanos, como *Porphyromonas gingivalis*. Finalmente, concluiu que os ratos podem ser imunizados contra patógenos periodontais, devendo ser observada a dosagem correta.

Selvig[71] (1994), discutiu os modelos animais que devem ser utilizados para o estudo da terapia periodontal regerativa, concluindo que existe potencial para se obter a regeneração. Porém, é importante estar-se consciente das limitações dos modelos animais, uma vez que todos os resultados devem ser questionados e não simplesmente extrapolados para o ser humano. Há vantagens óbvias nos modelos animais, como o fato de podermos criar defeitos de tamanhos iguais para

os tratamentos, ou a realização da marcação no local do defeito para representar a extensão do processo patológico. O autor acredita que não há diferença entre doença natural e induzida, pois, uma vez realizado o tratamento com sucesso, o resultado obtido será o mesmo, independente da história passada da superfície radicular em questão.

Buscando sempre compreender o processo de regeneração periodontal, Weinberg & Bral[80] (1999) investigaram vários modelos animais como: primatas não-humanos, ratos, hamsters, furão e cães a serem utilizados nos estudos de periodontia. Ratos e hamsters são mais indicados como modelos para estudos de cálculo e cárie, pois apresentam limitações para serem modelos de desenvolvimento da doença periodontal em razão da destruição óssea ser mais rápida nestes animais comparado com os humanos e ainda existe a erupção contínua dos dentes por toda a vida dos roedores. Furões talvez sejam os animais ideais para o estudo da doença periodontal. Os autores concluíram, portanto, que modelos animais podem ser utilizados para se avaliar a patogênese da doença periodontal humana e seus diversos tratamentos.

Realizando uma revisão dos aspectos biológicos críticos para o estudo da regeneração periodontal, incluindo modelos animais, Wikesjö & Selvig[81] (1999), concluíram que: a) os defeitos periodontais podem ser classificados em supra-ósseo, infra-ósseo, defeito de furca e recessão gengival ou ainda uma combinação destes, b) os animais utilizados nos estudos podem ser roedores, felinos, porcos, cães e primatas, c) ratos e outros roedores são freqüentemente usados nos estudos dos fenômenos biológicos básicos e os animais maiores em estudos de defeitos periodontais, d) no final do estudo os autores concluíram que as estratégias clínicas para obtenção da regeneração periodontal incluem biomodificação radicular e da ferida, visando a estimulação da formação de cemento e osso.

Um dos principais objetivos da terapia periodontal é a restauração do periodonto perdido e a conversão da superfície radicular

doente em uma região biologicamente compatível com a aderência e inserção de células do tecido epitelial e conjuntivo (Polson & Caton[59], 1982; Stahl[76], 1997; Isik et al.[34], 2000). Diversos estudos demonstram que a superfície radicular acometida pela doença periodontal exibe alterações como a presença de endotoxinas (Aleo et al.[4], 1974; Jones & O'Leary[35], 1978; Polson & Caton[59], 1982; Adriaens et al.[2], 1988), aspecto que pode interferir no processo de regeneração dos tecidos periodontais. Além disso, o tratamento mecânico manual ou ultrasônico resulta na formação da camada de *smear layer*, que também pode retardar o processo de regeneração (Polson et al.[63], 1984; Blomlöf et al.[15], 1997).

Visando ultrapassar todos estes inconvenientes, o tratamento químico da superfície radicular é utilizado para remover a *smear layer* e endotoxinas, abrir túbulos dentinários e expor fibras colágenas da matriz orgânica do cemento e da dentina (Blomlöf et al.[21], 1996; Blomlöf et al.[14], 1997; Bergenholtz & Babay[9], 1998). Há muitos anos, estudos (Register & Burdick[66], 1976; Polson & Proye[61], 1983;Blomlöf & Lindskog[13] , 1995) vêm relatando o aumento do ganho de nova inserção com o uso de condicionamento ácido. Um dos mais utilizados é o ácido cítrico (Register & Burdick[65], 1975; Register & Burdick[66], 1976; Polson & Proye[61], 1983; Hanes et al.[29], 1988), porém, outros como a tetraciclina (Mattson et al.[49], 1999; Babay[6], 2000; Isik et al.[34], 2000) e o EDTA (Blomlöf et al.[14], 1997; Mayfield et al.[50], 1998; Blomlöf et al.[19], 2000; Blomlöf et al.[20], 2000) também são empregados.

2.1 Regeneração periodontal

Regeneração periodontal é o restabelecimento da porção perdida do periodonto, devolvendo estrutura e função originais. Abrange, portanto, a formação de novo ligamento periodontal, cemento e osso alveolar (Garrett[27], 1996; Wikesjö & Selvig[81], 1999). As células que repovoam a área da ferida formam os componentes celulares e extracelulares dos novos tecidos (Melcher[51], 1976) e estudos *in vivo* demonstraram sua capacidade de promover a nova inserção na área previamente acometida pela doença periodontal (Nyman et al.[53], 1982; Mattson et al.[49], 1999).

Para que o processo de regeneração seja obtido, um dos primeiros aspectos a ser investigado é a possibilidade de uma nova união entre epitélio juncional e a superfície radicular. Listgarten[44] (1972) observou histologicamente os aspectos estruturais desta junção nos tecidos periodontais regenerados após cirurgia em macacos. Concluiu que o epitélio juncional regenera-se sobre a dentina que foi submetida a cirurgia e que esta união parece ser morfologicamente similar àquela do epitélio juncional com o tecido conjuntivo circunjacente. É interessante notar o aparecimento freqüente de fendas entre o epitélio e a superfície do dente. No entanto, estes sulcos ocorrem também no lado controle, o que leva a concluir que a fenda é conseqüência da técnica histológica realizada e não se relaciona com a união do epitélio juncional à superfície do dente (Listgarten[44], 1972).

Outros aspectos sobre o potencial de reparação dos tecidos periodontais também são discutidos. Melcher[51] (1976), decidiu separar estes tecidos em dois grupos para poder estudá-los. O primeiro grupo incluía epitélio gengival e tecido conjuntivo e o segundo, chamado porção alveolar do periodonto, era composto por osso alveolar, ligamento

periodontal e cemento. O autor relata que a gengiva é capaz de regenerar a arquitetura das suas fibras após a ferida. Quanto à regeneração óssea, esta é obtida por diferentes células como os osteócitos, células ósseas presentes na medula, células do endósteo e células osteogênicas do periósteo, sendo estas últimas as que mais contribuem para a cura da ferida óssea. Entretanto, o ligamento periodontal parece não regenerar tão rapidamente quanto o osso, fato que desencoraja a expectativa da regeneração periodontal. As células derivadas do tecido conjuntivo gengival ocupam a área da ferida mais rapidamente, e como elas não exibem potencial osteogênico, não ocorre o restabelecimento do osso ou ligamento periodontal.

Segundo Stahl[76] (1977) o objetivo de toda terapia periodontal é a regeneração dos tecidos. Contudo, o autor propõe que o procedimento cirúrgico pode resultar em diversas situações: a) permanência do sulco gengival com grande profundidade, b) aderência do epitélio juncional longo à raiz do dente, c) adesão de fibras colágenas orientadas paralelamente à raiz, d) inserção das fibras colágenas neoformadas na superfície da raiz. Inicialmente os mecanismos de reparação dos tecidos periodontais sugerem que o cemento acelular e as fibras colágenas que nele se inserem podem ser regenerados. No entanto, parece que determinantes biológicos limitam a capacidade regenerativa do cemento acelular. Nos sítios em que o cemento acelular foi exposto pela doença periodontal, o tratamento deveria consistir não apenas na remoção dos agentes irritantes como o cálculo, mas de outros agentes como as endotoxinas.

Para verificar a influência das alterações radiculares no processo de regeneração, Polson & Caton[59] (1982) produziram periodontite experimental em torno de um dos incisivos centrais de macacos e ambos os incisivos (doente e sadio) foram extraídos. O incisivo com periodonto reduzido foi transplantado para o alvéolo do dente contralateral, com periodonto normal e vice-versa. Os cortes

histológicos mostraram migração apical do epitélio juncional ao longo da superfície da raiz, até um ponto apical à crista óssea e ausência de inserção conjuntiva na raiz contaminada. Na raiz sadia, transplantada para o periodonto reduzido, os cortes histológicos demonstraram nova inserção à superfície radicular. Os autores concluíram que a contaminação da superfície da raiz, mais do que um periodonto reduzido, é um fator preponderante na regeneração periodontal.

A partir de 1982, começou a ser testada a hipótese de que células do ligamento periodontal seriam capazes de recolonizar a superfície radicular, se esta estivesse livre de epitélio e tecido conjuntivo. Nyman et al.[53] (1982) realizaram estudo com homens portadores de doença periodontal generalizada a fim de testar esta hipotése. Foi realizado retalho de espessura total, e posteriormente um filtro *Millipore* foi adaptado sobre o defeito infra-ósseo. Três meses depois, o dente foi removido em bloco com seu periodonto. A análise histológica demonstrou que houve formação de novo cemento com inserção de fibras colágenas e neoformação óssea no interior do defeito. Os autores concluíram que nova inserção pode formar-se sobre uma superfície radicular previamente doente.

Polson[58] (1986), começou um estudo que utilizou diferentes tipos de tratamentos regenerativos para tentar identificar quais eram os fatores limitantes e os fatores promissores relacionados ao processo de regeneração. Observou que após a raspagem radicular e curetagem do tecido mole, o cemento não recobria mais a superfície radicular e o epitélio juncional migrava em direção ao fundo da bolsa. Constatou que o tratamento periodontal convencional não resultava em nova inserção de tecido conjuntivo ou regeneração periodontal, mas em reparação. Contudo, a desmineralização da superfície radicular alterou completamente a resposta periodontal e resultou na formação de nova inserção de tecido conjuntivo.

Com o objetivo de compreender melhor a regeneração periodontal, Wikesjö et al.[83] (1991), estudaram os eventos iniciais da reparação que ocorrem na interface dentina-tecido conjuntivo. Utilizando microscopia de luz, os autores observaram que a nova inserção conjuntiva na dentina é mediada por uma adsorção inicial de proteínas plasmáticas para subsequente desenvolvimento e maturação do coágulo de fibrina. No entanto, apenas estudos futuros poderiam definir quais mecanismos atuam entre este coágulo e a superfície de dentina.

Wikesjö et al.[82] (1992), realizando uma revisão sobre os eventos biológicos que ocorrem na reparação periodontal, concluíram que a cicatrização do defeito periodontal é um processo muito complexo. Este, inclui uma superfície rígida avascular, além do posicionamento dental transgengival, o que aumenta a complexidade do processo. Esta cicatrização periodontal pode ser caracterizada pela maturação do tecido conjuntivo, limitada regeneração do osso alveolar e cemento e formação de epitélio juncional longo. Contudo, o tecido epitelial migra mais rapidamente que os outros tecidos, sendo necessária a utilização de artefatos para retardar ou prevenir esta proliferação, como por exemplo manipulação do tecido mole, utilização de membrana e enxerto ósseo. Mais recentemente vem sendo realizado o condicionamento radicular para melhorar a histocompatibilidade do cemento ou da dentina exposta.

A regeneração tecidual guiada (RTG), é uma nova técnica de tratamento periodontal que tem como finalidade obter a regeneração dos tecidos destruídos pela doença, incluindo formação de novo cemento contendo inserção funcional de fibras colágenas e preferivelmente com crescimento ósseo. Karring et al.[36] (1993), analisaram os conceitos biológicos da RTG realizada em estudos com humanos e animais. Os autores concluíram que o resultado final da terapia depende do tipo de célula que coloniza mais rapidamente a superfície radicular, sendo que na maioria dos casos, o epitélio prolifera apicalmente formando o epitélio juncional longo. Esta migração impede a

regeneração dos outros tecidos, contudo, também impede que ocorra anquilose e reabsorção radicular pelo contato direto do tecido conjuntivo e do tecido ósseo, com a superfície radicular. O tratamento de RTG é baseado em uma série de estudos que revelaram o potencial dos diferentes tecidos que participam deste processo biológico (Melcher [51], 1976; Wikesjö & Selvig[83], 1991).

A década entre 1982 e 1992 foi considerada a era do desenvolvimento da regeneração tecidual guiada. Scantlebury[69] (1993) designou 5 critérios que as membranas indicadas para regeneração periodontal deveriam atender: limitar a migração do epitélio em direção apical, separar os tipos celulares que deveriam repovoar a área do defeito, ter consistência que não dificulte sua colocação, manutenção e sutura, prover espaço para definir e proteger o novo tecido a ser regenerado e ser confeccionada com materiais biocompatíveis.

Ling et al.[43] (1994), observaram a resposta histológica dos tecidos periodontais regenerados frente à presença de placa bacteriana. Os autores concluíram que embora a resposta dos tecidos regenerados com RTG à placa ter sido mais lenta, o osso novo regenerado pode responder mais acentuadamente à atividade osteoclástica quando a placa bacteriana está presente. Isto sugere que um controle de placa ótimo deve ser enfatizado após a RTG.

Mattson et al[49] (1999), se propuseram a avaliar o potencial de duas membranas bioabsorvíveis sem a associação com materiais de enxerto no tratamento de defeitos infra-ósseos. Durante o ato cirúrgico as raízes foram condicionadas com tetraciclina, as membranas adaptadas de maneira que cobrissem todo o defeito e o retalho reposicionado. Após 6 meses, os autores observaram pelo método da reentrada cirúrgica que os dois tipos de membranas analisados conduziram a níveis semelhantes de redução da profundidade de sondagem, ganho de inserção e regeneração óssea dentro dos defeitos.

A teoria da regeneração tecidual guiada é viável, mas a previsão dos resultados quanto ao uso dos diversos tipos de membrana em defeitos periodontais ainda é discutido. Takata et al.[78] (2001) avaliaram diferentes tipos de membrana em relação a colonização *in vitro* por células do ligamento periodontal de roedores. Os autores concluíram que *per se* os materiais das membranas podem influenciar na proliferação e diferenciação das células do ligamento periodontal envolvidas no processo de regeneração óssea e periodontal.

Kuru et al.[39] (2001) analisaram pelos métodos de cultura celular e fluxo citométrico, o crescimento de células retiradas de diversos locais: a) células que povoavam a superfície da membrana periodontal, b) células que estavam presentes no tecido regenerado sob a membrana, c) células do ligamento periodontal de terceiros molares íntegros, d) células gengivais. Os autores verificaram que as células associadas à regeneração tecidual guiada, são similares às células do ligamento periodontal e células gengivais quanto ao tamanho e granulosidade, porém, expressam níveis mais elevados de colágeno tipo I, fibronectina e tenascina do que as células do ligamento periodontal normal. Além disso, este estudo também sugeriu que todos os tipos celulares contêm subpopulações de células que expressam fibronectina em diferentes níveis, evidenciando população celular heterogênea de células semelhantes à fibroblastos presentes no ligamento periodontal e o papel importante destas células no processo regenerativo após a cirurgia de RTG.

Kawaguchi et al.[37] (2001) investigaram a interface entre dentina desnuda e tecido periodontal regenerado em defeitos ósseos em alvéolos de ratos, utilizando técnica de imunohistoquímica. Os autores observaram zonas interfaciais entre a dentina e o tecido regenerado, que consistiam de material eletro-denso, semelhante à linha de cemento e imuno-reativo para osteopontina e sialoproteína óssea. Concluíram que o acúmulo de sialoproteína óssea e osteopontina são os eventos primários

que ocorrem durante a regeneração do cemento nas superfícies radiculares desnudas.

Hillmann et al.[31] (2002), determinaram as condições para a cultura de fibroblastos gengivais humanos em membranas biodegradáveis. Este estudo fez o cultivo de células durante quatro semanas em duas membranas bioreabsorvíveis: Bio-Gide® e Ethisorb®, ambas utilizadas rotineiramente em cirurgias periodontais, para melhorar o processo de cura dos defeitos. As células foram avaliadas por meio do microscópio eletrônico de varredura (MEV) e quantificadas utilizando um retículo, adaptado no microscópio de luz, além disso, o potencial osteogênico destas células para a reparação e regeneração dos tecidos orais foram caracterizados pela expressão dos RNAms. Como conclusão, os resultados deste estudo revelaram que as membranas são biocompatíveis e permitem a adesão e proliferação dos fibroblastos gengivais humanos *in vitro*. No entanto, a aderência e distribuição destas células foram mais homogêneas na membrana Ethisorb®, quando comparada com a Bio-Gide®. Os autores sugerem que os fibroblastos gengivais contenham populações de células responsivas para proteína morfogenética (BMP).

2.2 A superfície radicular

O desenvolvimento da doença periodontal é descrito como surtos de atividade que ocorrem por curto período de tempo, em sítios individuais. Os sítios que demonstram atividade periodontal destrutiva podem mais tarde não apresentarem mais esta condição ou ainda estarem sujeitos a um ou mais rompantes de atividade nos próximos períodos. Assim, sendo a doença periodontal um processo

intermitente, que atua alternando fases de destruição ativa dos tecidos com períodos de inatividade, o íntimo contato da superfície radicular com a flora bacteriana subgengival é mantida por longo período de tempo, fato que pode causar alterações estruturais nos tecidos da superfície radicular (Socransky et al.[75], 1984).

A contaminação das superfícies radiculares por produtos citotóxicos de origem bacteriana, especialmente por endotoxinas como o lipopolissacarídeo (LPS), que é um dos componentes da parede celular de bactéria gram-negativa, é investigada principalmente em estudos de culturas *in vitro* (Aleo et al.[4], 1974; Aleo et al.[3], 1975; Adriaens et al.[1], 1988), sendo recomendada a remoção excessiva do cemento para tornar esta superfície livre da contaminação de bactérias (Jones & O'Leary[35], 1978). Por outro lado, estudos mais recentes também *in vitro* (Hugles & Smales[32], 1990; Ökte et al.[55], 1999; Ökte & Bal[54], 2000; Zaman et al.[84], 2000), têm demonstrado que a grande quantidade de endotoxinas está localizada apenas superficialmente no cemento.

O cemento é um tecido mineralizado avascular, não inervado, povoado assimetricamente por células. Apesar do pequeno volume que este tecido ocupa, sua aposição na superfície radicular é necessária para interligar o dente ao osso, reparar fraturas radiculares e reabsorções, bem como para a adaptação funcional do dente. Atualmente, evidências indicam que o cemento é um reservatório de numerosos fatores de crescimento (Mariotti[48], 1993; Ten Cate[79], 2001).

Aleo et al.[4] (1974) utilizando dentes acometidos por doença periodontal avaliaram se as alterações no cemento, induzidas pela doença, aumentam a adsorção de endotoxinas na superfície radicular. Os autores ressaltam o fato da endotoxina, ser um potente agente inflamatório, que sem dúvida quando presente nas raízes dificulta a erradicação da doença. As raízes foram divididas em áreas exposta ao processo da doença e áreas envolvidas por osso e posteriormente incubadas em culturas de fibroblastos para o estudo dos efeitos

biológicos. Concluíram que havia grande quantidade de endotoxinas presentes no cemento e que ela diminui a capacidade de proliferação celular. O cemento com aparência clinicamente normal, também pode ser um reservatório de endotoxinas.

Aleo et al.[3] (1975), utilizando dentes humanos acometidos por doença periodontal, avaliaram *in vitro* por meio de cultura de fibroblastos, a quantidade de fibroblastos inseridos em raízes doentes. Verificaram que a porção da raiz exposta a doença teve pouca ou nenhuma célula inserida na sua superfície. No entanto, as raízes que foram tratadas com fenol e água ou que foram submetidas à remoção total de cemento, tiveram suas superfícies colonizadas normalmente pelos fibroblastos.

Jones & O'Leary[35] (1978) verificaram a efetividade da raspagem radicular para a remoção de endotoxinas bacterianas das raízes afetadas por doença periodontal. Os dentes foram divididos em grupos que receberam diferentes tratamentos: a) raspagem e aplainamento radicular *in vivo* e extração imediata, b) raspagem *in vivo* e extração imediata, c) sem tratamento, d) dentes extraídos e posteriormente raspados *in vitro*. Todos os grupos foram avaliados quanto à presença de endotoxinas e cálculo. Os resultados indicaram que realizando apenas a raspagem encontraram-se lipopolissacarídeos e endotoxinas de bactérias gram-negativas, aderidos ao cemento destas raízes, sugerindo que esta condição pode dificultar o processo de regeneração.

Baseados na hipótese que o cemento e a dentina radicular com seus túbulos dentinários podem agir como reservatórios de microrganismos periodontopatogênicos, Adriaens et al.[2] (1988) utilizando microscopia óptica e microscopia eletrônica, observaram as alterações estruturais e ultraestruturais destes tecidos. Os resultados mostraram invasão bacteriana no cemento e dentina radicular e defeitos em lacunas preenchidos por placa bacteriana, por vezes formando defeitos

multiloculares. Assim, conclui-se que o debridamento mecânico apenas, não é capaz de remover as bactérias presentes na dentina radicular, necessitando portanto, de métodos químicos auxiliares para a eliminação destes microrganismos.

Adriaens et al.[1] (1988), avaliaram a quantidade de bactérias presente nos túbulos dentinários de dentes acometidos por doença periodontal. Os autores observaram a presença de bactérias em camadas profundas da dentina, indicando que a placa bacteriana pode atingir distâncias consideráveis dentro deste tecido. No entanto, para minimizar esta invasão bacteriana, podem ser usados métodos auxiliares como os antimicrobianos sistêmicos ou antimicrobianos com sistemas de liberação lenta introduzidos dentro da bolsa periodontal. Os autores sugeriram que a raiz do dente afetado periodontalmente agiria como um reservatório bacteriano que ajudaria na recolonização de superfícies radiculares tratadas mecanicamente e também poderia levar à infecção pulpar.

Por outro lado, estudos mais recentes (Hugles & Smales[33], 1992; Ökte et al.[55], 1999; Petelin et al.[56], 1999; Beertsen et al.[8], 2001), têm questionado a tradicional remoção excessiva do cemento. Hughes & Smales[32] (1990), avaliaram a concentração de LPS no cemento de dentes acometidos por doença periodontal, após estes terem sido submetidos à raspagem radicular. Os resultados mostraram maior concentração de LPS na região apical da bolsa periodontal e grande variação entre as amostras. Os autores concluíram que o significado clínico do LPS associado ao cemento foi super enfatizado e que o aplainamento radicular excessivo para remover os LPS aderidos ao cemento não se justifica.

Em 1992, Hughes & Smales[33], avaliaram *in vitro* os efeitos que o cemento alterado por doença periodontal e ou associado ao LPS exerce sobre a inserção e orientação dos fibroblastos do ligamento periodontal. Os resultados mostraram que existem muitos outros fatores

além do LPS que interferem no resultado da nova inserção conjuntiva, como por exemplo, outros produtos bacterianos além do LPS, a adsorção de glicoproteínas salivares e a mineralização do cemento. Concluíram, portanto, que é necessário definir quais são todos estes fatores, a fim de determinar o melhor método de tratamento da superfície radicular para se promover a nova inserção.

Ökte et al.[55] (1999) avaliaram o cemento radicular de dentes acometidos ou não por doença periodontal, comparando seu conteúdo lipídico e polissacarídeo. A avaliação morfológica, demonstrou que existem áreas de reabsorção na superfície radicular dos dentes doentes, independente do tipo da periodontite. As colorações utilizadas na análise histológica, não mostraram LPS no interior do cemento, mas apenas nas camadas superficiais ou associadas com colonização microbiana. Porém, mais estudos são necessários para determinar se a terapia ideal a ser aplicada é apenas o tratamento mecânico ou uma associação deste com o tratamento químico.

Petelin et al.[56] (1999) estudaram a permeabilidade do cemento humano *in vitro* por meio de ressonância eletrônica paramagnética, utilizando dentes sadios e doentes. A partir destes foram obtidas amostras de cemento, originadas de diferentes regiões como: a) cemento exposto ao meio ambiente oral, b) cemento exposto ao meio ambiente da bolsa periodontal, c) cemento de dentes envolvidos periodontalmente mas não exposto à saliva ou à bolsa periodontal e d) cemento de dentes jovens extraídos por motivos ortodônticos. Os resultados indicaram que a interface cemento/dentina é uma barreira para a difusão de moléculas e esta foi maior nas áreas expostas à bolsa periodontal.

Beertsen et al.[8] em 2001, relacionaram a reabsorção cervical generalizada de raízes com a doença periodontal. O estudo envolveu um paciente com 24 reabsorções radiculares, que foram associadas com inflamação gengival, cultura da placa subgengival

positiva para *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* (patógenos periodontais) e reabsorção da crista óssea. Após um ano de tratamento que consistiu na alteração da dieta, administração de antibiótico e procedimentos de raspagem e aplainamento radicular, todas as lesões apresentavam tecido mineralizado radiopaco no seu interior e reparo na crista óssea. Assim, estas reabsorções radiculares parecem ser o resultado de efeitos combinados de microflora periodontopatogênica e dieta rica em ácido.

2.3 Desmineralização da superfície radicular

Estudos demonstram que a superfície radicular exerce uma grande influência no processo de reparação dos tecidos periodontais (Polson & Caton[59], 1982; Polson[58], 1986; Lowenguth & Blienden[46], 1993), por isso, há muito tempo os condicionamentos ácidos vêm sendo utilizados como coadjuvantes à raspagem radicular no intuito de acelerar a reinserção de fibras do ligamento periodontal (Lasho et al.[40], 1983, Polson et al.[63], 1984). A proposta deste condicionamento é principalmente remover *smear layer* resultante da raspagem e aplainamento radicular (Polson et al.[60], 1984; Blomlöf et al.[17], 1995), além de expor fibras colágenas da superfície radicular (Polson et al.[60], 1984; Blomlöf & Lindskog[13], 1995).

Register[64] (1973) foi um dos primeiros a utilizar a avaliação microscópica para superfícies tratadas com ácidos. Em seu trabalho, o autor realizou retalho de espessura parcial na face vestibular de 21 incisivos inferiores de dois macacos, dois cães e um gato, removeu o osso alveolar, ligamento periodontal e cemento e aplicou ácido

hidroclorídrico durante 15 minutos. A análise foi realizada nos períodos de três e seis semanas e três meses. As áreas cirúrgicas que foram submetidas à desmineralização apresentaram cementogênese e osteogênese avançada quando comparadas com o grupo controle, porém, no grupo experimental, cerca de 10% dos dentes sofreram reabsorção dentinária, sem no entanto evidenciar reações pulpares.

Dando continuidade ao estudo anterior, Register & Burdick[65] (1975) avaliaram diversos tipos de agente desmineralizador, quanto à sua concentração e tempo de aplicação. Foram avaliados os seguintes agentes: ácido hidroclorídrico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido tricloroacético e ácido fórmico, bem como um agente desmineralizador conhecido por RDO, o qual apresenta em sua composição ácidos, formaldeído, agentes umectantes e outras substâncias desconhecidas. Os autores constataram que parece haver um grau ideal de desmineralização a ser obtido, a fim de não prejudicar o potencial indutivo da matriz orgânica da dentina sobre a cementogênese, este nível ótimo se relaciona com pH e tempo de aplicação do agente desmineralizador. Os resultados histológicos mostraram que nova inserção com cementogênese também foi observada no grupo controle que não recebeu tratamento químico, porém, sem haver reparo completo, como ocorreu nas superfícies radiculares desmineralizadas. A partir deste estudo, os autores selecionaram o ácido cítrico com pH 1, aplicado por 2 a 3 minutos, como agente desmineralizador a ser utilizado clinicamente.

Register & Burdick[66] (1976), utilizando cães como modelo animal, realizaram condicionamento ácido de defeitos circunferenciais, interproximais, de bifurcação e deiscência, criados cirurgicamente após levantamento de retalho total, para avaliarem a influência da superfície desmineralizada no processo da nova inserção. As superfícies radiculares foram instrumentadas e submetidas ao condicionamento com ácido cítrico com pH 1,0 durante 2 minutos. Os

resultados mostraram formação de pinos de ancoragem de cemento no interior dos túbulos dentinários, sucesso na reparação de defeitos interproximais crônicos de uma parede e de deiscência, porém, o reparo de defeitos de bifurcação e defeito ósseo horizontal, não foi completo.

Fernyhough & Page[25] (1983), verificaram a capacidade de crescimento e síntese de fibroblastos em meios de cultura contendo raízes sadias ou acometidas pela doença periodontal. Estas raízes foram raspadas e aplainadas, submetidas a tratamento com ácido cítrico ou fibronectina e em seguida incubadas em cultura de fibroblastos por 48 horas. Os resultados analisados ao microscópio eletrônico de varredura mostraram que as superfícies radiculares independente da sua condição prévia, quando raspadas minuciosamente são compatíveis com a adesão de fibroblastos, porém, as raízes que receberam tratamento com ácido cítrico ou fibronectina tiveram maior quantidade de fibroblastos na superfície da raiz.

Lasho et al.[40] (1983) avaliaram os efeitos de agentes químicos e biológicos em superfícies radiculares de dentes acometidos pela doença periodontal após terem sido submetidas a raspagem ou raspagem e aplainamento. Os grupos foram divididos quanto ao tratamento recebido: a) ácido cítrico (pH 1) por 3 minutos; b) EDTA 15% por 5 minutos; c) hipoclorito de sódio por 5 minutos seguido de condicionamento com ácido cítrico a 5% por 30 segundos; d) hipoclorito de sódio por 5 minutos; e) deoxicolato de sódio a 2% por 1 minuto, em seguida lavado com água destilada, e condicionado com aplicação de fração plasmática IV de Cohn a 5% por 1 minuto. Os resultados mostraram que as superfícies que foram apenas raspadas e condicionadas com tratamentos químicos tiveram poucas fibras colágenas expostas. Contudo, o grupo que recebeu raspagem e aplainamento radicular e foi condicionado com ácido cítrico ou EDTA ou hipoclorito de sódio associado com ácido cítrico, mostraram remoção total dos debris, túbulos dentinários abertos e numerosas fibras

colágenas expostas. Os demais agentes não foram efetivos na remoção de debris e exposição de fibras colágenas.

Polson & Proye[61] (1983), utilizando técnicas histológicas diferenciaram fibrina e colágeno que se posicionavam na superfície radicular, nos estágios iniciais do processo de cicatrização periodontal, uma vez que a seqüência cronológica relacionada com a interação de fibrina e colágeno é o aspecto crítico para que ocorra a nova inserção. A cronologia ideal para este evento, é a ligação de fibrina na superfície radicular e posterior recolonização por colágeno. Após a extração de vinte e quatro dentes de macacos, realizou-se a remoção do cemento e ligamento periodontal, sendo que em doze dentes também foi realizada aplicação de ácido cítrico de pH 1 durante 3 minutos. Após este procedimento, houve o reimplante dos dentes sem qualquer contenção associada; posteriormente estes foram extraídos nos períodos de 1, 3, 7 e 21 dias. Os eventos de cicatrização iniciaram-se com a formação de fibrina e coágulo, que foram substituídos por fibras colágenas aderidas à superfície radicular, sem evidências de formação de cemento. A grande diferença entre os grupos se relacionou com a migração do epitélio juncional, sendo que no grupo teste, o epitélio permaneceu próximo à junção esmalte-cemento, fato que não ocorreu no grupo controle. Outro aspecto que diferenciou os grupos foi o contato mais íntimo da fibrina com a superfície radicular nas raízes tratadas com ácido cítrico.

Polson et al.[63] (1984) utilizando MEV, caracterizaram a superfície radicular de dentes de macacos, em duas situações: raspada e aplainada ou raspada e aplainada em associação com tratamento de ácido cítrico pH 1 durante 3 minutos. A superfície dos dentes submetidos ao procedimento convencional mostrou irregularidades, presença de *smear layer* e poucos túbulos dentinários expostos. No entanto, as superfícies tratadas com ácido cítrico exibiram amplos orifícios de túbulos dentinários e zonas intertubulares com aspecto fibrilar.

Polson et al.[62] (1986) avaliaram a resposta do epitélio e do tecido conjuntivo em espécimes obtidos a partir de dentes humanos doentes, após a superfície radicular ter sido previamente tratada com ácido cítrico pH 1, durante 3 minutos. Os espécimes foram implantados verticalmente nas incisões realizadas no dorso dos ratos, permanecendo uma das extremidades para fora da pele e avaliados nos períodos de 1, 3, 5 e 10 dias. Análise histométrica e histológica foram realizadas, concluindo que a superfície desmineralizada predispõe à aderência de células e fibras, com conseqüente inibição da migração epitelial.

Smith et al.[73] (1987) examinaram o efeito do ácido cítrico e várias concentrações de fibronectina na inserção de novo tecido conjuntivo após terapia periodontal cirúrgica em cães. A fibronectina está envolvida no mecanismo de ligação do colágeno a vários substratos, inclusive a fibrina. O resultado do estudo mostrou que o uso da fibronectina aumentou a inserção de tecido conjuntivo na superfície radicular e a combinação desta substância com o ácido cítrico parece produzir resultados ainda melhores para ganho de inserção.

Smith et al.[72] (1987), também avaliaram a influência do condicionamento de raízes com ácido cítrico pH 1 durante 3 minutos, associado com fibronectina e laminina concomitantemente. Cães com doença periodontal ocorrida naturalmente foram submetidos a cirurgia periodontal e subseqüente aplicação das substâncias experimentais e sacrificados 120 dias após o tratamento. A análise ao microscópio de luz mostrou que a reparação periodontal foi similar entre os grupos controle e experimental, não havendo nova inserção de tecido conjuntivo, deposição de cemento ou crescimento ósseo evidentes. Concluíram, portanto, que a utilização da combinação de fibronectina e laminina não é justificada.

Polson & Hanes[60] (1987) compararam a resposta celular do tecido conjuntivo e do epitélio, em espécimes de dentina obtidos a partir de raízes doentes e normais. Os espécimes foram condicionados com ácido cítrico pH 1 durante 3 minutos e posteriormente implantados

em número de dois, no dorso de ratos, de maneira que uma das extremidades permanecesse externamente à superfície da pele. Os animais foram sacrificados 10 dias após o procedimento e o material submetido à análise histométrica e histológica. Os resultados mostraram que não houve formação de cemento, porém, a desmineralização da dentina predispôs à orientação celular e adesão de fibras, com conseqüente inibição da migração epitelial. Entretanto, não houve diferença entre a inserção de tecido conjuntivo nas superfícies de dentina desmineralizada de dentes sadios ou acometidos pela doença periodontal.

A resposta inicial da reparação do tecido conjuntivo em superfícies dentinárias desmineralizadas ou não foi descrita por Hanes et al.[29] (1988). Foram utilizados fragmentos dentinários previamente submetidos a tratamento químico com ácido cítrico pH 1 durante 3 minutos (grupo experimental) e fragmentos que não receberam tal tratamento (grupo controle). Os fragmentos foram implantados verticalmente na pele de ratos, de modo que uma das extremidades permanecesse externamente à pele. Os animais foram sacrificados 24 horas após o procedimento e a resposta inicial foi muito diferente entre os dois grupos, sendo que o experimental apresentou maior quantidade de células aderidas. Talvez esta diferença possa estar relacionada com os efeitos de interação entre as várias proteínas e a fibrina aderida ao substrato de colágeno resultante do tratamento com ácido cítrico.

Fardal & Lowenberg[24] (1990), avaliaram a adesão, migração e orientação de fibroblastos gengivais humanos em raízes de dentes humanos após o período de vinte e um dias *in vitro*. Este trabalho foi dividido em dois grupos de experimento: 1- avaliação da resposta do fibroblasto à diferentes tratamentos em raízes afetadas periodontalmente e 2- comparação entre os efeitos do ácido cítrico, EDTA e digestão da colagenase sobre a resposta de fibroblastos em raízes sadias. No primeiro experimento, onze dentes humanos, sendo três sadios e oito

doentes foram submetidos a diferentes tratamentos. Quatro dos dentes doentes foram raspados e aplainados e quatro permaneceram sem tratamento, posteriormente, dois dentes de cada grupo recebeu tratamento com ácido cítrico pH 1 por 3 minutos. Portanto, no experimento 1 havia cinco grupos: a) raízes doentes aplainadas, b) raízes doentes aplainadas e desmineralizadas com ácido cítrico, c) raízes doentes não tratadas, d) raízes doentes não tratadas e desmineralizadas com ácido cítrico, e) raízes sadias (controle). No experimento 2, sete dentes sadios após a raspagem, foram seccionados transversalmente, obtendo 60 segmentos radiculares. Vinte e quatro destes foram condicionados com ácido cítrico pH 1 por 3 minutos e outros vinte e quatro condicionados com EDTA a 18%, pH 7,2 por 30 minutos. Logo, no experimento 2 haviam mais cinco grupos: a) raízes desmineralizadas com ácido cítrico, b) raízes desmineralizadas com ácido cítrico e digestão da colagenase, c) raízes desmineralizadas com EDTA a 18% durante 30 minutos, d) raízes desmineralizadas com EDTA e digestão da colagenase, e) raízes controles, sem tratamento. Os resultados mostraram que a adesão celular do primeiro ao vigésimo primeiro dia foi significativamente menor em raízes doentes não tratadas quando comparada com raízes doentes tratadas, desmineralizadas ou sadias. Os autores concluíram que a raspagem e aplainamento radicular melhoraram a compatibilidade da superfície radicular, a associação de tratamento mecânico com condicionamento ácido deixou a raiz com biocompatibilidade semelhante a de raízes sadias, a desmineralização radicular com ácido cítrico apenas, melhorou a biocompatibilidade destas e que o maior crescimento celular após o condicionamento ácido é resultante da combinação entre a exposição de fibrilas colágenas e a criação de um ambiente mais favorável.

Eschler & Rapley[23] (1991) compararam a efetividade de diferentes métodos de instrumentação radicular utilizando a microscopia de luz. Os autores examinaram a quantidade de cemento removido e

pela análise histométrica, quantificaram o material residual corado (cemento) após cada tratamento. Noventa dentes receberam os seguintes tratamentos: a) instrumentação com curetas Columbia 13-14, b) instrumentação ultrasônica com a ponta P-10 convencional, c) instrumentação ultrasônica com a ponta P-10 diamantada, d) associações destes procedimentos com aplicação de solução de antiformina por 5 minutos e imersão em solução de ácido cítrico a 5% por 30 segundos e lavados por 1 minuto, e) tratamento único com solução de antiformina e ácido cítrico, sem a instrumentação mecânica prévia. Observou-se que a remoção completa do cemento foi rara e que apenas a utilização do tratamento químico não foi efetiva para a remoção de placa e cálculo.

O ácido fosfórico 37% (pH 2) e ácido cítrico 18% (pH 2) foram testados por Biagini et al.[10] (1992), quanto à sua capacidade de permitir o crescimento de fibroblastos gengivais humanos *in vitro*. O ácido fosfórico foi aplicado durante 1 minuto e o ácido cítrico durante 45 segundos em fragmentos de raízes normais e doentes, sem que tivessem recebido tratamento mecânico prévio. O tratamento com ácido fosfórico resultou em uma proliferação celular mais efetiva caracterizada por fibroblastos tipicamente alongados e dispostos paralelamente à superfície radicular. Por outro lado, a superfície tratada com ácido cítrico demonstrou fibroblastos sem a forma alongada característica, adquirindo bordas poligonais com prolongamentos citoplasmáticos irregulares e menor densidade celular.

Lowenguth & Blienden[46] (1993) realizaram uma revisão do papel da superfície radicular alterada na cura da doença periodontal do ponto de vista clínico e biológico. Concluíram que a desmineralização desta superfície aumenta o reparo da ferida periodontal, pois cria uma superfície mais adequada para a regeneração dos tecidos. Os estudos *in vitro* (Fardal & Lowenberg[24] 1990) e *in vivo* (Register[64] 1973; Polson & Proye[61] 1983; Blomlöf et al.[14] 1997) avaliados, indicaram haver grande

potencial de adesão de células e fibras nestas superfícies desmineralizadas.

Hennequim & Douillard[30] (1995) avaliaram a quantidade de cálcio (Ca), fósforo (P) e magnésio (Mg) na raiz de dentes humanos após o tratamento com ácido cítrico pH 1, durante 3 minutos. Verificaram que há grande variação entre as concentrações de Ca, P e Mg nas áreas radiculares analisadas, consequentemente, a desmineralização pode estar sujeita a falhas em alguns locais mais resistentes. Portanto, o insucesso da reparação periodontal após o condicionamento com ácido cítrico, pode ser devido às propriedades da camada externa da dentina radicular.

Blomlöf et al.[17] (1995) investigaram se as substâncias ácidas com pH baixo, quando aplicadas durante longo tempo poderiam causar efeitos necrosantes imediatos no tecido periodontal circunjacente, prejudicando sua reparação. Trinta e seis dentes de macacos, foram submetidos à cirurgia periodontal com aplicação de ácido fosfórico a 37% pH 1 durante 20 segundos e 3 minutos. Após oito semanas, os animais foram sacrificados e a reparação foi avaliada por análise histométrica. Os autores concluíram que a substância ácida, quando utilizada por longo tempo, prejudica o processo de cicatrização periodontal devido ao seu efeito necrosante. Foi observada maior migração do epitélio, menor inserção histológica e maior recessão gengival no grupo que recebeu maior tempo de aplicação, quando comparado ao grupo que recebeu tempo menor de aplicação.

Blomlöf & Lindskog[12] (1995) investigaram a possibilidade de substâncias ácidas de pH baixo como o ácido cítrico (pH 1,0) e ácido fosfórico a 37% ou substâncias com pH neutro como o EDTA a 24% produzirem efeito necrosante nos tecidos periodontais após aplicação por 20 segundos e 3 minutos. Oito macacos foram submetidos à cirurgia periodontal e a atividade da enzima lactato-desidrogenase (LDL) foi verificada no retalho total e no ligamento periodontal. Esta enzima está

envolvida na glicólise anaeróbia para a obtenção de energia. A análise demonstrou que o gel de EDTA a 24% não induziu necrose durante o período do experimento. As substâncias ácidas de pH baixo produziram necrose imediata nas células dos tecidos periodontais, porém, este efeito não parece ser permanente.

Visando comparar a textura das superfícies dentinárias após o condicionamento destas com ácido cítrico (pH 1), ácido fosfórico a 37% (pH 1) e EDTA a 24% (pH 7), Blomlöf & Lindskog[13] (1995) utilizaram 56 dentes de sete macacos. Os autores também compararam o modo de aplicação: passiva ou ativa, o tempo de aplicação: 20 segundos ou 3 minutos de cada substância e seus possíveis efeitos na colonização celular das superfícies dentinárias condicionadas. Concluíram que o EDTA foi capaz de remover material mineral seletivamente da superfície dentinária, expondo assim a matriz colágena e favorecer a colonização celular e subsequente formação de tecido conjuntivo. Por outro lado, as superfícies condicionadas com ácidos de baixo pH, tiveram a remoção da parte mineral e da matriz colágena, além de necrose das células do ligamento periodontal adjacente.

Blomlöf et al.[18] (1996), verificaram se os agentes condicionantes atuando em pH neutro poderiam melhorar a reparação periodontal quando comparados com agentes condicionantes de pH baixo. Trinta e dois dentes de quatro macacos foram submetidos à cirurgia periodontal, para remoção de cemento, ligamento e osso alveolar das raízes expostas, condicionamento com ácido cítrico (pH 1) durante 3 minutos e EDTA a 24% (pH 7) durante 8 minutos e subsequente irrigação abundante com solução salina. O retalho foi reposicionado e suturado e após 8 semanas os animais foram sacrificados. Foi realizada a análise histométrica dos tecidos, visando verificar a presença de recessão gengival, bolsa periodontal, formação de epitélio juncional longo, tecido conjuntivo, cemento reparador, osso alveolar e possível anquilose. Em geral o grupo tratado com EDTA exibiu menor recessão gengival e bolsa

periodontal e maior inserção histológica total (epitélio juncional longo, tecido conjuntivo e cemento reparador), quando comparado com o grupo controle e tratado com o ácido cítrico. Assim, parece que o EDTA, além de remover a *smear layer*, expõe maior quantidade de fibras colágenas que as substâncias de baixo pH e não produz necrose nos tecidos circunjacentes à sua aplicação. Além disso, a exposição de matriz colágena da dentina pode permitir a retenção de substâncias biologicamente ativas como os fatores de crescimento, utilizadas no processo de regeneração periodontal.

Blomlöf et al.[21] (1996) avaliaram a eficácia da aplicação subgengival do EDTA na remoção da *smear layer* e exposição das fibras colágenas em procedimentos não-cirúrgicos em humanos. Vinte e quatro dentes acometidos por periodontite foram divididos aleatoriamente em 4 grupos submetidos a diferentes tratamentos: a) mecânico, b) mecânico associado com imersão em tripsina a 1% durante 20 minutos, c) mecânico associado com condicionamento das raízes com EDTA a 24 % durante 2 minutos e posterior irrigação abundante com solução salina, d) tratamento idêntico ao item anterior, em associação com a tripsina do grupo b. Todos os procedimentos foram realizados previamente à exodontia que foi imediata. As superfícies foram avaliadas ao MEV e demonstraram que o grupo tratado com EDTA e o grupo com EDTA associado a tripsina, exibiram túbulos dentinários abertos com exposição de fibras colágenas, portanto, o gel de EDTA pode ser um coadjuvante importante nos procedimentos periodontais não cirúrgicos.

Blomlöf[11] (1996) comparou a morfologia da superfície do cemento resultante do ataque ácido com substâncias de pH baixo e neutro em 16 dentes de macacos e 16 dentes humanos. Cada um destes grupos foi subdividido em quatro subgrupos que receberam diferentes tratamentos: a) grupo controle - tratamento mecânico, b) tratamento mecânico associado com EDTA a 24% com pH 7, c) tratamento mecânico associado com ácido cítrico com pH 1, d) tratamento mecânico

associado com ácido fosfórico a 37% com pH 1 durante 3 minutos. A remoção dos ácidos foi realizada com irrigação abundante de água deionizada durante 5 minutos. Os resultados mostraram que o EDTA expõe seletivamente as fibras colágenas, tanto do cemento sadio quanto do doente, enquanto as substâncias de baixo pH produzem variados graus de erosão nas superfícies.

Blomlöf et al.[15] (1997) estudaram a formação da *smear layer* após diversos métodos de tratamento periodontal e sua remoção pelo gel de EDTA. Vinte e quatro dentes humanos acometidos por doença periodontal severa foram divididos aleatoriamente em três grupos que receberam tratamento com instrumentação ultra-sônica, manual e rotatória, sendo que a metade dos dentes de cada grupo teve seu tratamento associado com aplicação do gel de EDTA a 24% durante 2 minutos e foi lavada durante 3 minutos. A análise ao MEV, mostrou que o gel de EDTA é eficiente na remoção da *smear layer* e exposição das fibras colágenas, independente do tratamento prévio realizado, uma vez que todos os tipos de instrumentação produziram *smear layer*.

Baseados em estudos que indicam o EDTA como substância auxiliar à terapia periodontal (Blomlöf & Lindskog[13], 1995; Blomlöf et al.[18], 1996; Blomlöf et al.[21], 1996), Blomlöf et al[14] (1997) avaliaram os efeitos de diferentes concentrações de EDTA ao microscópio eletrônico de varredura, quanto à remoção da *smear layer* e exposição de fibras colágenas. As concentrações testadas foram de 1,5%, 5%, 15% e 24%, todas aplicadas durante 2 minutos em 12 dentes humanos extraídos por motivos periodontais. Os autores concluíram que as concentrações de 1.5% e 5% não foram suficientes para dissolver a *smear layer* e que a concentração de 15% dissolveu a *smear layer* e expôs fibras colágenas, porém, em menor quantidade do que o EDTA a 24%. Ressaltaram que paralelamente a concentração, o tempo de aplicação também é importante para aumentar o efeito da remoção da *smear layer*, expondo assim mais fibras colágenas.

Blomlöf et al.[16] (1997) avaliaram a vantagem da utilização simultânea da instrumentação ultrasônica com o gel de EDTA a 24% para a remoção da *smear layer* e exposição de fibras colágenas *in vitro* e *in vivo*. Vinte e quatro dentes humanos extraídos devido a destruição periodontal severa foram divididos em grupos submetidos à instrumentação ultrasônica com ponta convencional e modificada - a qual consegue levar o agente irrigante que pode ser a água ou o EDTA a 24% até a sua extremidade. A análise ao MEV mostrou que quando se associa o EDTA à instrumentação ultrasônica realizada com a ponta modificada o resultado é mais eficiente, comparando-se com a ponta convencional, uma vez que esta apenas remove a *smear layer* da região cervical.

A fim de comparar a textura da superfície radicular após aplicação de diferentes agentes condicionadores, Bergenholtz & Babay[9] (1998), utilizaram dentes humanos acometidos por doença periodontal. Estes dentes foram instrumentados com aparelho de ultra-som e posteriormente submetidos à aplicação ativa ou passiva de solução salina, cloridrato de tetraciclina pH 1,8, solução saturada de ácido cítrico pH 1,0 e EDTA a 8% pH 7,3 durante 10, 30 ou 180 segundos. Os resultados sugerem que o tipo e modo de aplicação do agente afetaram a superfície de diferentes maneiras e podem ser importantes na regeneração do tecido periodontal. Os autores concluíram que 10 segundos pode ser um tempo adequado para a aplicação do ácido cítrico, porém, a tetraciclina e o EDTA necessitam de mais tempo para remover completamente a *smear layer* do cemento.

Mayfield et al.[50] (1998), avaliaram o efeito do gel de EDTA como substância auxiliar à terapia cirúrgica em humanos. Trinta e seis dentes com defeito periodontal infraósseo, sem envolvimento de furca, foram divididos aleatoriamente em grupo controle submetido à cirurgia periodontal e grupo experimental submetido à cirurgia associada ao condicionamento da raiz com EDTA a 24% (pH 7) durante 3 minutos.

As avaliações clínica e radiográfica consistiram na análise do ganho de inserção, diminuição da profundidade de sondagem, medida de recessão gengival e ganho ósseo, estas mensurações foram obtidas no início do tratamento e após 6 meses. Na reavaliação verificou-se que ambos os grupos apresentaram ganho ósseo e de inserção, não havendo diferença estatisticamente significante entre eles.

Segundo Sampaio[68] (1999), o gel de EDTA a 24% é o detergente mais eficaz para a remoção da *smear layer* produzida pela instrumentação com curetas de McCall em dentes humanos sadios. Este estudo utilizou microscópio eletrônico de varredura para verificar a eficiência dos seguintes detergentes: lauril sulfato de sódio, Plax, detergente de mamoma e EDTA a 24%, aplicados com bolinha de algodão durante 1 a 3 minutos. Os resultados mostraram que o detergente lauril sulfato de sódio não removeu a *smear layer*, o Plax e o detergente de mamoma mostraram resultados semelhantes entre si e superiores ao lauril sulfato de sódio, porém, não removeram a *smear layer* satisfatoriamente. Enquanto o gel de EDTA 24% demonstrou ser eficiente para a remoção da *smear layer.*

Outra substância que pode ser utilizada para desmineralizar a superfície radicular é a tetraciclina. Isik et al.[34] (2000), avaliaram e compararam com MEV, as alterações produzidas por diferentes tempos de aplicação e concentrações de hidrocloreto de tetraciclina (HCl-TTC) em superfícies radiculares de humanos. Quarenta e oito fragmentos de raízes foram divididos em 8 grupos que receberam condicionamento com diferentes concentrações de HCl-TTC: 0, 10, 25, 50, 75, 100, 125 e 150 mg/ml, com o tempo de aplicação variando entre 1, 3 e 5 minutos. Como resultado foi verificado que as soluções de HCl-TTC com concentrações entre 50 e 150 mg/ml produziram abertura significativa dos túbulos dentinários. Em relação à variável tempo, todos foram eficientes para a remoção da *smear layer*.

Ökte & Bal[54] (2000), analisaram a topografia de superfícies radiculares de dentes humanos envolvidos periodontalmente após diferentes modalidades de tratamento químico. As raízes foram divididas longitudinalmente em quatro segmentos. Cada segmento recebeu um dos seguintes tratamentos: a) cloreto de cetilpiridinio (CPC) a 0,1%, b) lauril sulfato de sódio (SLS) a 2% durante 1, 3 e 5 minutos, c) profilaxia com pasta (grupo polimento) e d) apenas tratamento mecânico (grupo controle). Após os tratamentos, os segmentos foram lavados com água destilada durante 1 minuto. Os resultados mostraram que as superfícies tratadas com CPC ou SLS diferem muito dos espécimes apenas polidos ou do grupo controle, pois, dependendo do tempo de aplicação das substâncias ácidas, a camada superficial foi parcialmente ou totalmente removida, dando ao cemento aspecto nodular, com exposição de discretas fibrilas colágenas e abertura dos túbulos dentinários. Debris estavam presentes nos grupos polimento e controle, sendo que colônias bacterianas puderam ser vistas apenas no grupo controle. Este estudo limitou-se a demonstrar as alterações morfológicas do cemento, sendo necessários mais estudos para concluir a influência destas alterações no processo de regeneração periodontal.

Baker et al.[7] (2000) utilizando MEV, avaliaram a influência do condicionamento de raízes na adsorção e adesão de sangue à superfície dentinária. Os espécimes de dentes humanos foram tratados com ácido cítrico e expostos a sangue fresco para posterior avaliação em MEV. Os resultados sugerem que esta avaliação poderá efetivamente distinguir superfícies de dentina com potencial de alta adsorção e adesão de elementos sangüíneos. Os espécimes desmineralizados apresentaram fina rede de fibrina diretamente aderida à superfície dentinária, entremeada com elementos celulares principalmente eritrócitos.

Após alguns estudos mostrarem que as alterações morfológicas nas superfícies radiculares variam de acordo com o pH da

substância utilizada (Blomlöf & Lindskog[13], 1995; Blomlöf et al.[18], 1996), Babay[5] (2000) comparou a textura da superfície dentinária de raízes acometidas por doença periodontal após o condicionamento com hidrocloreto de tetraciclina e EDTA. Trinta dentes foram submetidos a dois métodos de tratamento: instrumentação rotatória e manual. Posteriormente foram divididos em três grupos, sendo que cada grupo recebeu um tipo de condicionamento aplicado com cotonete, durante 3 minutos: a) solução salina (grupo controle), b) solução saturada de hidrocloreto de tetraciclina pH 1,8, c) EDTA a 8% com pH 7,3. Os resultados mostraram que o grupo controle tinha a superfície coberta por *smear layer*, enquanto os dois grupos experimentais mostraram túbulos dentinários abertos e remoção da *smear layer*. O autor concluiu portanto, que apesar da diferença entre o pH das substâncias testadas, a alteração morfológica produzida na superfície radicular foi semelhante.

Blomlöf et al.[19] (2000) baseados em estudos (Blomlöf et al.[21], 1996; Blomlöf et al.[16], 1997) prévios sobre o condicionamento de raízes com gel de EDTA, investigaram se a administração subgengival deste ácido poderia ser um método auxiliar efetivo para a raspagem e aplainamento radicular subgengival e supragengival. Noventa e um pacientes, sendo quarenta e um portadores de doença periodontal e cinqüenta em estágio de manutenção, foram submetidos à raspagem e aplainamento radicular subgengival e irrigação com solução salina durante 20 segundos (grupo controle) ou irrigação com gel de EDTA a 24% com pH 7,2, durante 2 minutos, seguido por irrigação com solução salina durante 20 segundos (grupo experimental). A análise clínica através de índice de placa e sangramento, profundidade de sondagem e ganho de inserção clínica, foi mensurada no início e seis meses após a realização do tratamento. Os autores constataram que não existe diferença estatisticamente significante entre os grupos controle e experimental com respeito ao ganho de inserção clínica ou redução de profundidade de sondagem. Entretanto, os pacientes não tratados

tiveram uma maior redução na profundidade de sondagem e ganho de inserção clínica do que os pacientes do programa de manutenção.

Visando complementar o estudo sobre EDTA, Blomlöf et al.[20] (2000) também avaliaram os efeitos do gel de EDTA em cirurgias periodontais. Sessenta e oito pacientes com periodontite crônica, totalizando noventa sítios foram avaliados sob os mesmos parâmetros do trabalho anterior, no início, três e seis meses após o tratamento, porém, com a utilização de sonda periodontal computadorizada. Os sítios foram submetidos à terapia cirúrgica e divididos aleatoriamente para receberem três diferentes tratamentos: a) aplicação passiva de solução fisiológica com bolinha de algodão por 20 segundos; b) aplicação passiva de solução aquosa saturada de ácido cítrico (pH=1) por 20 segundos e c) aplicação de gel de EDTA a 24% com seringa por 2 minutos. Todos os grupos foram lavados abundantemente com solução salina após o tratamento e os retalhos reposicionados e suturados. Não houve diferença estatisticamente significante entre os tratamentos avaliados com respeito ao ganho se inserção ou redução da profundidade de bolsa após três e seis meses.

Zaman et al.[84] (2000) avaliaram quantitativamente a adesão e orientação de células do ligamento periodontal humano *in vitro* sobre cemento e dentina de dentes com doença periodontal, após seu condicionamento com substâncias de pH baixo e neutro. Os dentes foram raspados e aplainados e então divididos em quatro grupos em que variou o agente condicionador da superfície: a) ácido cítrico com pH 1,2; b) EDTA a 24% com pH 7,04; c) hidrocloreto de tetraciclina 100 mg/ml com pH 2,0, d) tratamento mecânico. Todos os tratamentos químicos foram realizados através da imersão do fragmento radicular no agente durante 3 minutos. Estes espécimes permaneceram em cultura de fibroblastos durante um, três e sete dias. Os resultados não mostraram diferença estatisticamente significante com relação à aderência e orientação das células do ligamento periodontal, quando se comparou o cemento e a

dentina dos grupos tratados. Contudo, os espécimes tratados com EDTA e ácido cítrico tiveram maior aderência e orientação das células do ligamento periodontal em comparação com os grupos não tratados. O autor ressalta que nem sempre é necessária a remoção excessiva do cemento.

Recentemente em 2001, Pilatti[57] avaliou o grau de remoção da *smear layer* da superfície radicular através do condicionamento ácido com gel de EDTA utilizando diferentes concentrações, tempos e métodos de aplicação. Dentes humanos foram raspados, aplainados e posteriormente fragmentos das raízes foram submetidos ao condicionamento com gel de EDTA com concentrações que variavam de 5 a 24%, tempo de aplicação entre 1 e 3 minutos e modo de aplicação passivo ou ativo. Os espécimes foram avaliados em MEV que revelou haver maior remoção da *smear layer* nos grupos tratados com EDTA, mais especificamente, concluiu que a superfície radicular quando tratada com gel de EDTA aplicado ativamente durante 3 minutos demonstrou maior remoção da *smear layer*.

Babay[6] (2001), investigou a correlação entre a rugosidade da superfície radicular doente e sua susceptibilidade para inserção de fibroblastos, após estas terem sido tratadas com diferentes procedimentos. Para o estudo foram utilizadas 18 raízes que foram divididas aleatoriamente em grupos submetidos a diferentes tratamentos: a) raspagem e aplainamento radicular; b) raspador elétrico de EMS (Nyon, Switzerland) e c) raspador elétrico de Amdent (Nynäshamn, Sweden). Três espécimes de cada grupo acima foram tratados com solução salina ou ácido cítrico pH 1,0 ou hidrocloreto de tetraciclina pH 1,8 ou EDTA pH 7,3 durante 3 minutos. Posteriormente os espécimes foram incubados em cultura de fibroblastos por 72 horas e examinados em microscópio eletrônico de varredura. A análise constatou que havia maior número de fibroblastos aderidos aos espécimes tratados com ácido cítrico, hidrocloreto de tetraciclina e EDTA do que naqueles apenas

raspados e aplainados, sugerindo que há maior adesão de fibroblastos em superfícies rugosas do que em superfícies lisas.

Friensen et al.[26] (2002), tinham como objetivo primário do seu estudo comparar a eficácia de uma tira de tetraciclina ou várias tiras associadas à raspagem e aplainamento radicular, com a raspagem e aplainamento radicular apenas, ou com grupo controle (não tratado) em vinte e quatro pacientes. O segundo objetivo era comparar o volume do fluido gengival e a concentração da tetraciclina no fluido em bolsas tratadas com as tiras, avaliando o tempo de inserção e a facilidade de se inserir uma ou várias tiras. Os resultados mostraram que uma ou várias tiras auxiliaram na redução da profundidade de sondagem quando comparado com os outros dois grupos, porém, o sangramento na sondagem no grupo em que houve a inserção de várias tiras diminuiu significantemente quando comparado aos demais grupos. Não houve efeito do tratamento sobre o fluido gengival, no entanto houve uma redução significativa no volume do fluido e o tempo de inserção de uma tira ou várias tiras foi de 1,9 minuto e 3,25 minutos respectivamente. Os autores concluíram que o tratamento com liberação local da tetraciclina é superior ao tratamento de raspagem e aplainamento radicular apenas, quando avaliada a redução na profundidade de sondagem.

Smith et al.[74] (2002), investigaram os efeitos clínico e microbiológico da azitromicina como coadjuvante ao tratamento não cirúrgico da periodontite do adulto. O estudo foi duplo cego e realizado com quarenta e seis pacientes, que foram orientados quanto a higiene oral e submetidos à raspagem e aplainamento radicular. As medidas para avaliação clínica foram o índice de placa, sangramento gengival, cálculo e profundidade de sondagem, enquanto a avaliação microbiológica foi realizada por meio de coleta de amostra de bolsas periodontais com profundidade maior ou igual a 6 mm. Os resultados mostraram que o grupo tratado com azitromicina exibiu menor profundidade de sondagem e sangramento à sondagem após 22 semanas de tratamento. Os autores

concluíram que a azitromicina pode ser um método auxiliar eficaz no tratamento da periodontite do adulto, particularmente em bolsas mais profundas.

Ricardo[67] (2002) avaliou o uso de soluções condicionadoras da superfície radicular associadas à instrumentação periodontal para melhorar o reparo tecidual. Oitenta animais permaneceram com ligadura ao redor do 2° molar superior esquerdo, durante 5 semanas para a indução da periodontite. Após este período, a ligadura foi removida e os animais tratados com raspagem radicular apenas, ou associada a irrigação com solução de tetraciclina a 10%, minociclina a 10%, ácido cítrico a 8%, ou cloreto de sódio a 0,9%. Os animais foram sacrificados 3, 7, 21 e sessenta dias após o tratamento. Os resultados mostraram que independente da solução utilizada, o grupo sacrificado com 60 dias, apresentou melhor reparo tecidual.

QUADRO 1 – Estudos *in vivo* com EDTA

VIDE PÁGINA 124

QUADRO 2 – Estudos *in vitro* com EDTA

VIDE PÁGINA 125

QUADRO 3 – Estudos comparativos *in vivo* utilizando o EDTA

VIDE PÁGINA 126

QUADRO 4 – Estudos comparativos *in vitro* utilizando o EDTA (continua)

VIDE PÁGINA 127

QUADRO 4 – Estudos comparativos *in vitro* utilizando o EDTA

VIDE PÁGINA 128

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar, por meio de análise histológica, o efeito do gel de EDTA a 24%, pH 7,0 na reparação dos tecidos periodontais, quando utilizado como coadjuvante ao procedimento de raspagem e aplainamento radicular, em doença periodontal induzida em ratos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Para este experimento foram utilizados quarenta e cinco ratos (*Rattus novergicus*, variação *albinus*, Wistar) machos, com dez semanas de idade, pesando cerca de 250g, fornecidos pela Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP. O projeto do presente trabalho está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa dessa faculdade, sob o protocolo de nº 021/2001-PA/CEP (Anexo A). Os animais foram mantidos em número de três por gaiola, em temperatura ambiente, alimentados com água e ração comercial *ad libitum*.

Foram divididos aleatoriamente em três grupos contendo 15 animais cada e submetidos aos seguintes procedimentos:

a) grupo I - tratamento mecânico associado a gel de EDTA 24%;
b) grupo II - tratamento mecânico;
c) grupo III - tratamento mecânico associado a gel placebo (sem EDTA).

4.2 Metodologia

Os procedimentos foram realizados na sala do Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, cuidadosamente higienizada com álcool 70% antes dos procedimentos e com materiais esterilizados.

Os animais foram pesados para quantificação do anestésico geral e relaxante muscular utilizados para a anestesia. A solução anestésica foi composta de solução de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-,3-tiazina (Rompum da Bayer do Brasil) como relaxante muscular, associado com quetamina (Francotar da Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda) como anestésico geral. A proporção foi de 1:0,5ml, utilizando-se 0,1ml da solução para cada 100g de peso do animal, administrada via intramuscular.

O trabalho foi dividido em duas etapas. Na primeira foi realizada a indução da doença periodontal e na segunda o tratamento da mesma, avaliando o processo de reparação induzido pelos diferentes tratamentos.

4.2.1 Indução da doença periodontal

Após a anestesia, os animais foram imobilizados em uma mesa metálica apropriada, que os mantinha com a boca aberta. A indução da periodontite foi realizada com a inserção de um fio de linha de algodão (Figura 1a) marca Corrente W 10 ao redor dos segundos molares superiores dos animais (Figura 1b). A ligadura foi mantida por

cinco semanas, tempo adequado para o desenvolvimento da doença periodontal (Figura 1c). Durante este período os animais passaram por uma verificação semanal da estabilidade da ligadura dentro do sulco gengival, para o que foram anestesiados com 0,15ml da solução anestésica, nos casos em que a ligadura se soltou, esta foi novamente reposicionada.

4.2.2 Tratamento e tempo de sacrifício

Após o período de cinco semanas, a ligadura foi removida e a superfície radicular raspada e aplainada com cureta McCall 13/14 adaptada (Figura 1d). A porção mais apical da bolsa periodontal foi marcada na superfície radicular por meio da inserção de uma lima endodôntica Hedströen n°15 no espaço interproximal, realizando-se vinte movimentos no sentido vestíbulo lingual, para a remoção da dentina nesta região (Figura 1e).

Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos, cada grupo composto de 15 ratos:

a) grupo I - tratado (E): o gel de EDTA a 24%, pH 7,0 (Biodinâmica) foi aplicado na bolsa periodontal, através de uma seringa de ponta fina (Figura 1f), após o tratamento mecânico e permaneceu durante 2 minutos;

b) grupo II - controle (C): tratamento mecânico (raspagem e aplainamento radicular);

c) grupo III - placebo (P): o gel placebo foi injetado de maneira semelhante ao grupo I. Este gel tinha a mesma composição e mesmo pH do veículo utilizado no gel de EDTA.

Em todos os grupos foi realizada irrigação com cloreto de sódio a 0,9% durante 1 minuto.

Cada grupo foi subdividido em três subgrupos com relação ao tempo de sacrifício, nos prazos de 4, 10 e 28 dias após o tratamento. A divisão dos animais nos grupos experimentais está ilustrada no Quadro 5 abaixo:

Quadro 5: Divisão dos grupos experimentais

Tratamento	Tempo de Sacrifício	Número de Animais	Grupo
EDTA	04 DIAS	5	E4
EDTA	10 DIAS	5	E10
EDTA	28 DIAS	5	E28
CONTROLE	04 DIAS	5	C4
CONTROLE	10 DIAS	5	C10
CONTROLE	28 DIAS	5	C28
PLACEBO	04 DIAS	5	P4
PLACEBO	10 DIAS	5	P10
PLACEBO	28 DIAS	5	P28

Para o sacrifício, os animais foram anestesiados e a seguir decapitados em guilhotina, para remoção em bloco da maxila.

65

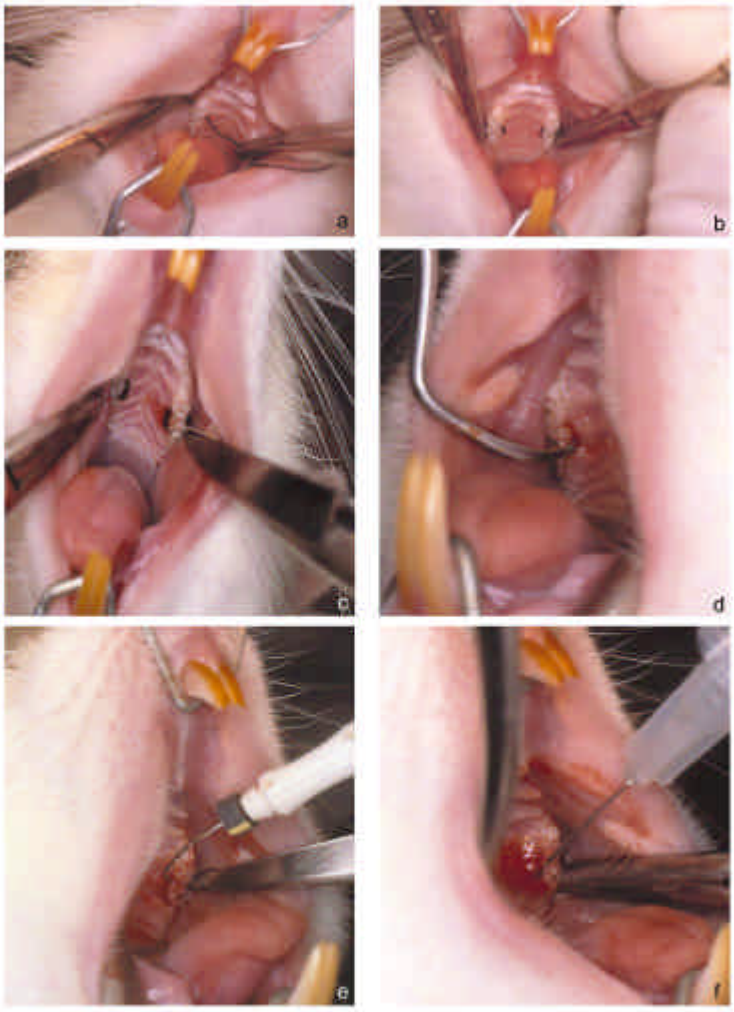

FIGURA 1 - **Metodologia:** a) inserção da ligadura ao redor do 2º molar superior; b) ligadura em posição para início da indução da doença periodontal; c) 5 semanas após a inserção da ligadura - indução da doença periodontal; d) raspagem e aplainamento radicular; e) marcação na região mais profunda da bolsa; f) condicionamento ácido da superfície radicular.

4.3 Análise histológica

Os fragmentos de maxila contendo dentes molares foram fixados em solução de formol neutro a 10%. Após um período máximo de 48 horas de fixação, esses seguiram para a descalcificação, em solução de ácido fórmico a 60% (Labcenter) em formol a 10%, durante aproximadamente 15 dias. As peças foram então preparadas para a inclusão em parafina, com a face vestibular paralela ao plano de corte. Foram realizados cortes seriados com cerca de 5µm de espessura e coradas com Hematoxilina e Eosina (HE-Merck & Co., Inc.) e Tricrômico de Masson (Trichrome Stain AB Solution Accustain-Sigma Diagnostics).

A análise histológica foi realizada sob microscópio de luz, sendo observada a reação inflamatória presente e a reparação dos tecidos periodontais. A reparação periodontal foi avaliada pela localização do epitélio e a presença ou não de inserção conjuntiva em relação à área de dentina desgastada na superfície radicular pela lima endodôntica. Também foi dada atenção à presença de cemento, osso neoformado, reabsorção radicular e/ou anquilose. A coloração tricrômica de Massom foi realizada para a identificação de fibras colágenas no interior do tecido conjuntivo e para a avaliação da direção destas fibras no tecido próximo à superfície radicular.

4.4 Análise histomorfométrica

A análise histomorfométrica foi realizada com base nos estudos de Mandarim[47] (1995) sobre método estereológico. O número de lâminas utilizado para a contagem foi de quatro para cada bloco, sendo uma de cada nível, escolhidas aleatoriamente (Taga & Stipp[77], 1994), o que correspondeu a um total de 400 pontos analisados por animal. O valor em porcentagem do preenchimento tecidual da área, correspondeu à média dos valores obtidos nas quatro lâminas avaliadas.

Para esta análise, foi utilizado um retículo com padrão quadrangular composto de cem pontos resultantes das intersecções entre dez linhas horizontais e dez verticais, superpostas à imagem histológica a ser analisada. A objetiva utilizada foi a de 20x de aumento. O retículo foi alinhado no vértice de cada marcação e projetado sobre o campo histológico (Greenstein et al.[28] 1981) que correspondia à área da marcação realizada com a lima endodôntica Hedströen n°15. Foram quantificados os pontos de intersecção que recaiam sobre o epitélio, tecido conjuntivo inflamado e tecido conjuntivo sadio, para determinar a porcentagem de preenchimento total da marcação, bem como a porcentagem de cada tecido neste preenchimento.

4.5 Análise estatística

O planejamento seguiu o modelo fatorial para análise de epitélio, tecido conjuntivo inflamado, tecido conjuntivo sadio e área total de preenchimento. Para todos os tecidos considerados foram estudadas as variáveis: tratamento (EDTA, Controle e Placebo) e tempo de sacrifício (4, 10, 28 dias).

Os resultados obtidos por meio das análises histológica e histomorfométrica, foram submetidos à análise estatística de variância (ANOVA) de dois fatores de efeito fixo (Tratamento e Tempo de sacrifício). Analisou-se também a interação entre estes fatores. A distribuição da análise, portanto, corresponde aos seguintes ítens:

a) tratamento;
b) tempo de sacrifício;
c) interação entre tratamento e tempo de sacrifício.

Após o teste ANOVA, aplicou-se o teste de Comparação Múltipla de Tukey para os fatores que mostraram diferença significativa, adotando-se nível de significância (p) de 5%.

Foram utilizados para realização das análises os programas computacionais; MINITAB *for windows* (versão 13.1, 2000, Minitab Inc.); STATISTICA *for windows* (versão 5.0, 1995, Statsoft Inc.) e STATISTIX *for windows* (versão 7.0, 2000, Analytical Software Co).

5 RESULTADOS

5.1 Análise histológica

Os cortes histológicos mostram fragmentos de maxila contendo o primeiro, segundo e terceiro molares em ordem decrescente de tamanho. O segundo molar superior do rato apresenta quatro cúspides e quatro raízes (Schour & Massler[70] 1942), porém, no plano de corte analisado, contam-se três cúspides e duas raízes. Em geral, estes dentes são constituídos na porção coronária por dentina tubular e apresentam um espaço claro ao redor da coroa, região anteriormente ocupada pelo esmalte que foi removido pelo processo de desmineralização. Na porção radicular, o cemento reveste toda a raiz, sendo do tipo acelular até o terço médio e a partir desta região até o ápice do tipo celular ou secundário.

A polpa é formada por tecido conjuntivo frouxo, células fusiformes e estrelares, substância fundamental amorfa abundante, numerosos vasos sagüíneos e feixes nervosos. No contorno da polpa, uma nítida camada de odontoblastos pode ser observada em contato com a pré-dentina. Esta camada na porção coronária é única, com odontoblastos de formato alongado, enquanto na porção radicular, modificam seu formato para cúbicos ou achatados. Abaixo da camada odontoblástica encontra-se uma camada praticamente acelular e mais internamente existe a camada rica em células. Os cornos pulpares

acompanham a anatomia externa da coroa, sendo que há um grande estreitamento na região central da câmara pulpar.

O ligamento periodontal é o tecido conjuntivo fibroso, ricamente vascularizado e celularizado, que circunda as raízes dos dentes e une o cemento radicular ao osso alveolar. As fibras colágenas do ligamento periodontal se dispõem em direções variadas, conforme sua localização.

Entre os dentes observa-se tecido gengival com formato piramidal, revestido por epitélio pavimentoso, estratificado, não queratinizado, na porção sulcular, seguido pelo epitélio juncional, não queratinizado. Este é mais largo na parte correspondente à coroa do dente, tornando-se mais estreito em direção à junção cemento-esmalte e apresenta camada basal retificada. Por vezes encontram-se pêlos incluídos no epitélio. A lâmina própria subjacente é constituída por tecido conjuntivo fibroso rico em células, permeado por escassas células inflamatórias mononucleares, principalmente na região subepitelial. As fibras colágenas são os principais constituintes do tecido conjuntivo. Estas fibras, tanto na gengiva, quanto no ligamento periodontal podem ser distribuídas aleatoriamente, porém, a maioria delas se dispõe em grupos de feixes com orientação bem definidas. As fibras colágenas do ligamento periodontal estão inseridas no osso que reveste a parede do alvéolo dentário, sendo denominadas Fibras de Sharpey.

As descrições acima referem-se ao dente, periodonto e osso alveolar em condições de normalidade. Durante o período do estudo que constou de indução e tratamento da doença periodontal, houve algumas alterações neste quadro. Os aspectos morfológicos observados são semelhantes nos três grupos de tratamento (EDTA, controle e placebo), correlacionando-se para cada período de sacrifício (4 dias, 10 dias e 28 dias) e serão descritos em conjunto. Alguns aspectos peculiares a cada tratamento serão também mencionados. Portanto as descrições histológicas do estudo estarão divididas em:

a) período de 4 dias;
b) período de 10 dias;
c) período de 28 dias.

Todos os animais, independente do período de sacrifício e tratamento a que foram submetidos, apresentam a marca realizada com lima Hedroströen n°15 na superfície radicular do segundo molar superior esquerdo. Esta marcação exibe formato côncavo, estando localizada em dentina, na região de maior profundidade de sondagem da bolsa periodontal. Geralmente se observa um espaço claro entre o tecido mole e a superfície radicular. Esta separação entre os tecidos, provavelmente, é conseqüência da técnica histológica (Listgarten[44], 1972).

5.1.1 Período de quatro dias

Na grande maioria dos animais observa-se placa bacteriana sobre a superfície do epitélio e necrose da camada mais superficial do mesmo. Além disso, há aumento da espessura do epitélio, sendo que o epitélio juncional passa a apresentar projeções em direção à lâmina própria por vezes englobando tecido conjuntivo. Em toda a espessura do epitélio nota-se a presença de células epiteliais com graus variados de vacuolização (Figura 3d), e em alguns espécimes, fragmentos de dentina no epitélio ou no tecido conjuntivo subjacente.

Verifica-se migração do epitélio juncional em direção apical, alcançando o terço coronário e, por vezes, o terço médio, no grupo controle (Figura 3c). Nos grupos tratado com EDTA e placebo, a

migração epitelial é mais acentuada, chegando a preencher toda a marca (Figura 2a) ou ainda a ultrapassar o limite apical da mesmo (Figura 3a).

Na região subepitelial observa-se presença de rede de fibrina (Figura 3b), edema e moderado infiltrado inflamatório constituído predominantemente por neutrófilos e macrófagos, com algumas células gigantes multinucleadas. A região de furca apresenta áreas de reabsorção do septo interadicular, demonstrando que a doença periodontal foi realmente induzida por meio da inserção da ligadura (Figura 2b). Reabsorções radiculares são verificadas em várias raízes, independente do tratamento recebido. Reabsorções ósseas na crista do osso alveolar também foram observadas

Por vezes, na câmara pulpar na direção da marca, observa-se dentina reparadora, com canalículos pequenos e tortuosos (Figura 2c).

73

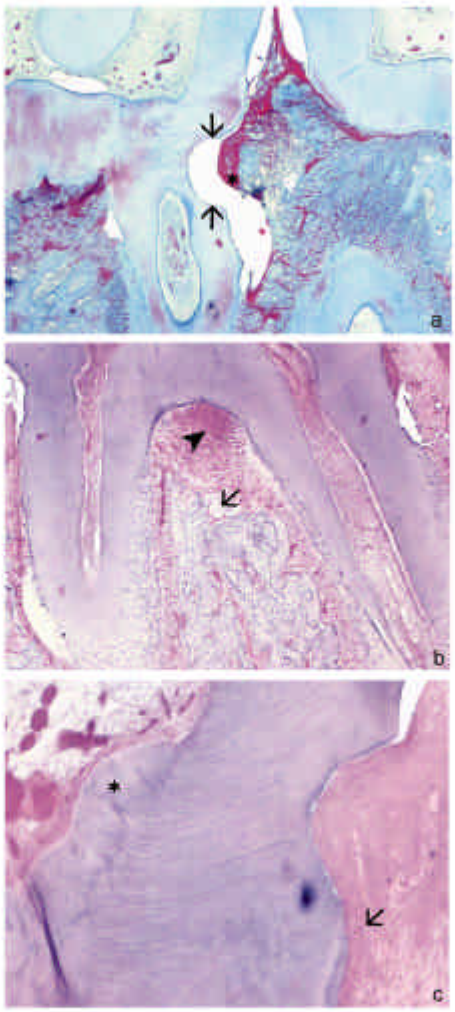

FIGURA 2 - **Período de 4 dias:** a) EDTA: marcação na superfície radicular (→) e epitélio preenchendo a marcação (✱). Tricrômico de Masson, aumento original de 25X; b) EDTA: reabsorção óssea (→) e ninho epitelial (➤) na região de furca. HE, aumento original de 25X; c) placebo: epitélio proliferando apicalmente à marcação (→) e dentina reparadora (✱). HE, aumento original de 100X.

74

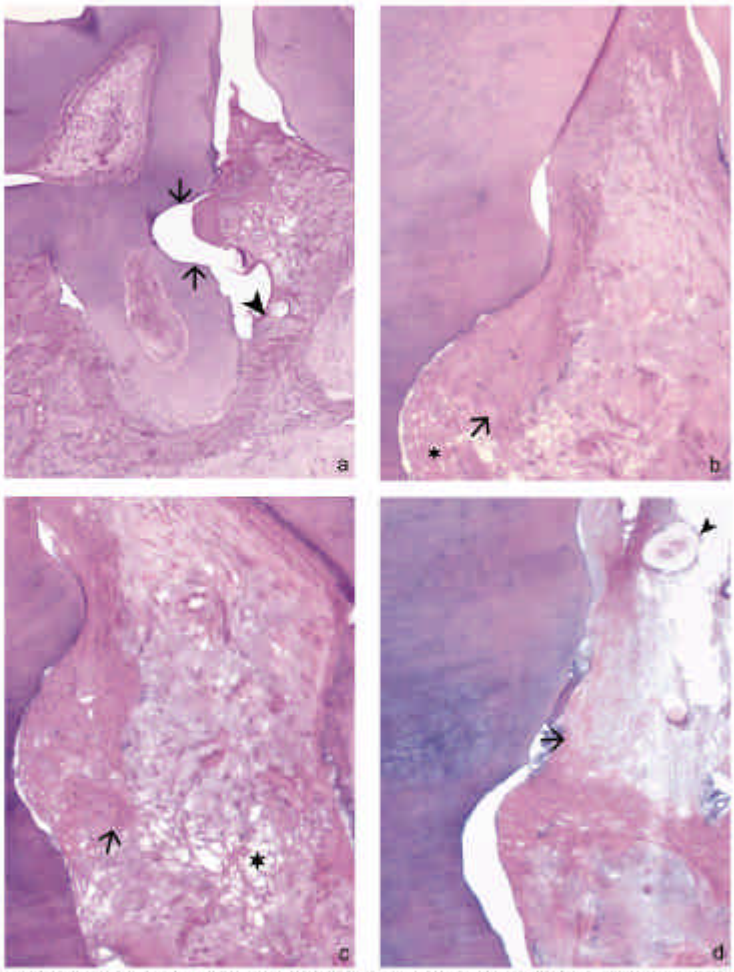

FIGURA 3 - **Período de 4 dias:** a) EDTA: marcação na superfície radicular (→), projeção do epitélio ultrapassando a marcação (➤). HE, aumento original 25X; b) controle: epitélio proliferando até o terço médio da marcação (→) e rede de fibrina (✱). HE, aumento original 100X; c) placebo: epitélio proliferando na região da marcação (→), fibrina e tecido conjuntivo desorganizado apicalmente à marcação (✱). HE, aumento original 100X; d) controle: degeneração das células superficiais do epitélio (→) e pêlo (➤). HE, aumento original 100X.

5.1.2 Período de dez dias

Na grande maioria dos animais observa-se placa bacteriana sobre a superfície do epitélio (Figura 4a), porém, a necrose da camada mais superficial do epitélio é verificada apenas em alguns animais. O epitélio mantém sua espessura aumentada e fragmentos de dentina ainda podem ser observados no seu interior e também no tecido conjuntivo subepitelial de alguns espécimes.

O epitélio é mais espesso na porção coronária, exibindo camada basal mais retificada na extremidade mais próxima ao ápice, porém, algumas projeções epiteliais em direção à lâmina própria continuam a ser observadas (Figura 4c). Existem áreas em que o epitélio juncional longo preenche ou ultrapassa a marca da superfície radicular, geralmente na forma de uma projeção alongada e bastante delgada, com poucas camadas de células (Figura 4b) .

No tecido conjuntivo observa-se grande quantidade de fibroblastos, associados a discreto infiltrado inflamatório mononuclear (Figura 4d). Além disso, também verifica-se a presença de fibras colágenas com orientação variada, dentina reparadora, focos de inflamação e ilhotas de epitélio na região da furca e reabsorção da crista óssea e do septo interadicular. Neste período não se nota mais a rede de fibrina.

76

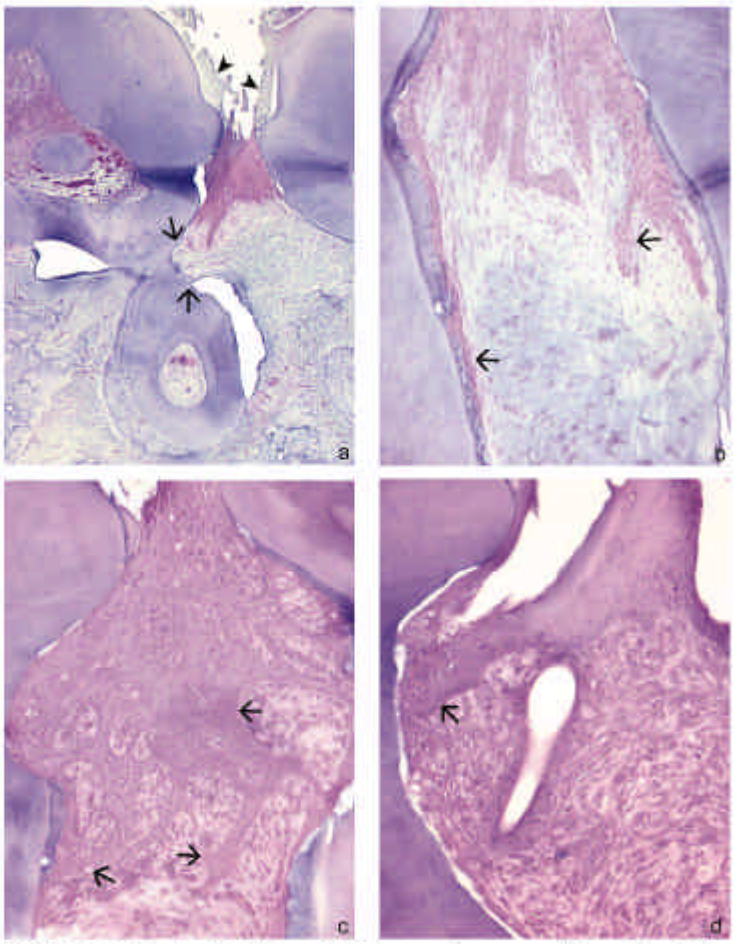

FIGURA 4 - **Período de 10 dias:** a) EDTA: marcação na superfície radicular (→) e placa bacteriana (➤). HE, aumento original de 25X; b) EDTA: projeção epitelial fina e alongada ultrapassando a marcação. HE, aumento original de 100X. c) EDTA: projeções epiteliais mais espessas e em maior número ultrapassando a marcação (→) e infiltrado inflamatório subepitelial. HE, aumento original de 100X; d) placebo: proliferação epitelial até o terço médio da marcação (→), tecido conjuntivo altamente celularizado e infiltrado inflamatório subepitelial. HE, aumento original de 100X.

5.1.3 Período de 28 dias

Na grande maioria dos animais observa-se placa bacteriana na superfície do epitélio, contudo, não se verifica mais necrose das células superficiais e vacuolização epitelial (Figura 5a).

O epitélio mantém a proliferação para apical, preenchendo quase totalmente a marcação (Figura 5b), no entanto, as projeções epiteliais são mais escassas (Figura 6a e b) . A espessura epitelial ainda está aumentada, principalmente na face voltada para o segundo molar, porém, com a camada basal mais retificada (Figura 6c).

Na lâmina própria, raras células inflamatórias estão presentes. As fibras colágenas se dispõem de maneira mais organizada, tendendo a uma orientação paralela ao longo eixo do dente (Figura 6d) . Estas são mais espessas e estão entremeadas por fibroblastos fusiformes e volumosos. A crista óssea e o septo inter-radicular permanecem com reabsorção.

78

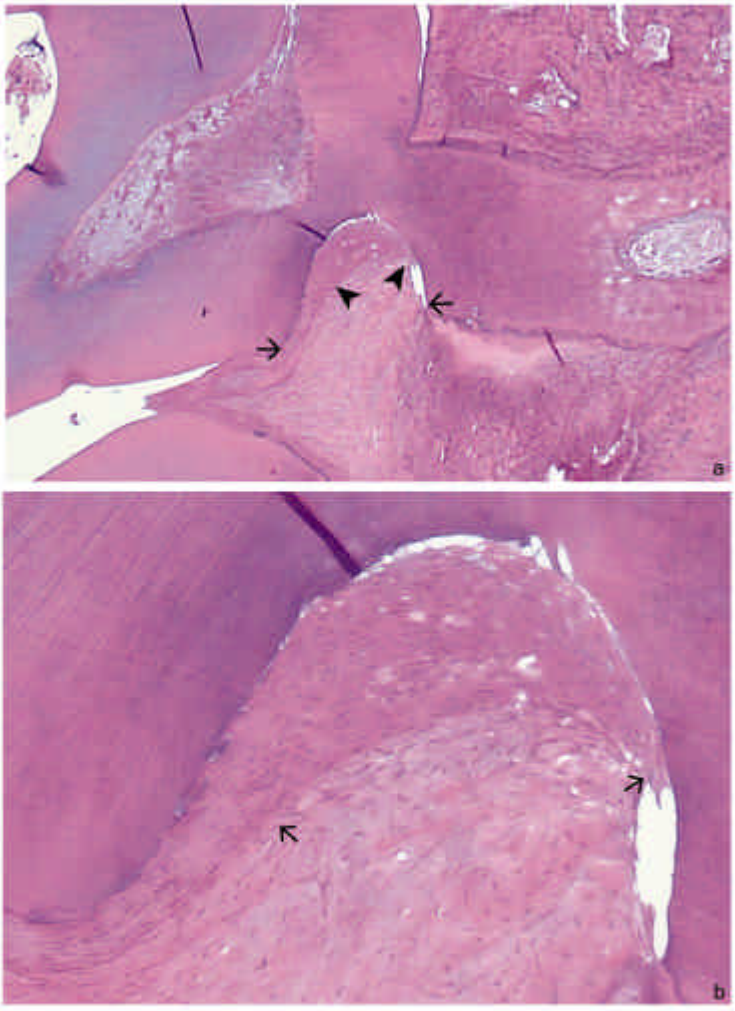

FIGURA 5 - **Período de 28 dias:** a) EDTA: marcação na superfície radicular (→), epitélio (➤). HE, aumento original de 25X. b) projeção epitelial (→): detalhe da figura anterior. HE, aumento original de 100X.

79

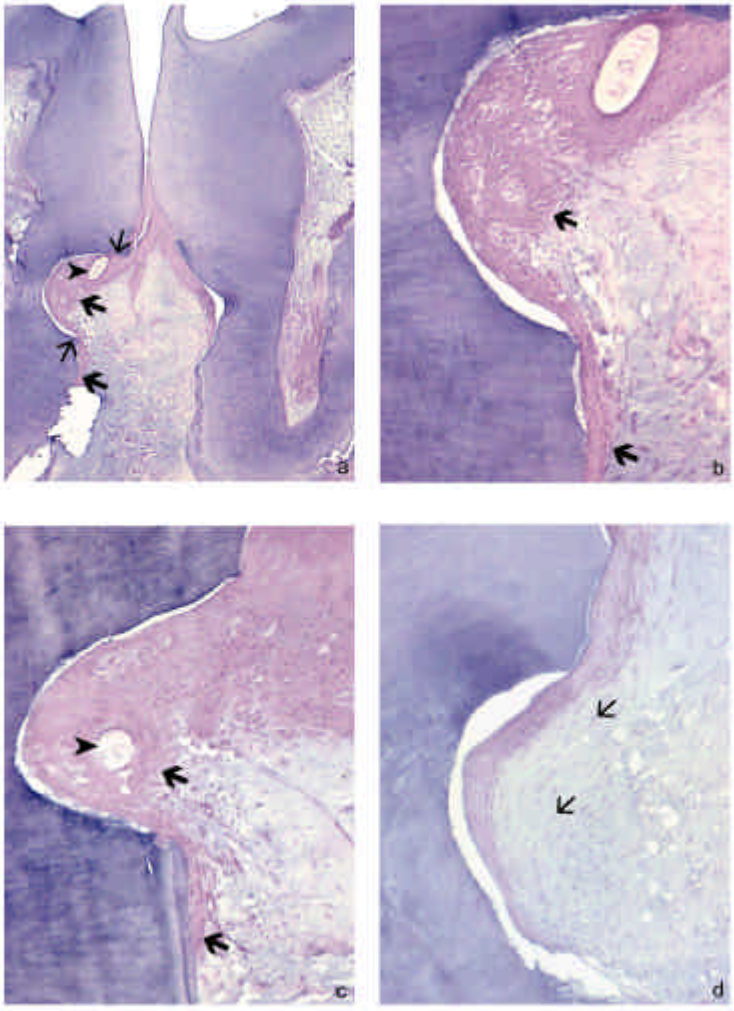

FIGURA 6 - **Período de 28 dias:** a) placebo: marcação na superfície radicular (→), epitélio (➔) e pêlo (➤). HE, aumento original de 25X. b) epitélio proliferando apicalmente a marcação (➔): detalhe da figura anterior. HE, aumento original de 100X. c) controle: epitélio proliferando apicalmente a marcação (➔) e pêlo (➤).HE, aumento original de 100X d) placebo: tendência de orientação paralela dos fibroblastos (→). HE, aumento original de 100X.

5.2 Análise estatística

Para padronização da análise, foi considerado apenas o segundo molar superior esquerdo da cada animal. A análise estatística dos dados obtidos por meio da histomorfometria, foi realizada avaliando-se os diferentes tecidos que preencheram a marcação na superfície radicular: epitélio, tecido conjuntivo inflamado, tecido conjuntivo sadio e área total de preenchimento. Serão consideradas separadamente as variáveis: a) tratamento; b) tempo de sacrifício e c) interação entre: tratamento e tempo de sacrifício.

Foi utilizada a técnica de análise de variância dos fatores envolvidos (ANOVA), associada ao Teste de Tukey, para determinar as semelhanças e diferenças entre as variáveis estudadas. O nível de significância adotado foi de 5%.

5.2.1 Epitélio

As médias de porcentagem de preenchimento da marcação por tecido epitelial, estão apresentadas na Tabela 21 (apêndice A). Os dados da estatística descritiva analisando a variável tratamento estão representados na Tabela 1.

Tabela 1- Estatística descritiva dos dados referentes ao preenchimento da marcação (%) por **epitélio** em relação ao tratamento realizado

Tratamento	N*	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Mediana	Valor Máximo
E	15	0,1846	0,0781	0,1000	0,1775	0,3725
C	15	0,1527	0,0731	0,0250	0,1550	0,2525
P	15	0,1980	0,1355	0,0400	0,1950	0,5300

*: número de amostras

Os resultados da estatística descritiva analisando a variável tempo de sacrifício estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 - Estatística descritiva dos dados referentes ao preenchimento da marcação (%) por **epitélio** em relação ao tempo de sacrifício

TS*	N**	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Mediana	Valor Máximo
4	15	0,2318	0,1139	0,0675	0,2100	0,5300
10	15	0,1764	0,0743	0,0975	0,1425	0,3400
28	15	0,1270	0,0812	0,0250	0,1000	0,3250

*: tempo de sacrifício **: número de amostras

Para o fator interação entre o tratamento e o tempo de sacrifício, verificou-se a seguinte Tabela 3:

Tabela 3 - Estatística descritiva dos dados referentes ao preenchimento da marcação (%) por **epitélio** em relação a interação entre tratamento e tempo de sacrifício

Variável T*-TS**	I'	N''	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Mediana	Valor Máximo
E-4	1	5	0,2205	0,0967	0,1400	0,1825	0,3725
C-4	2	5	0,1810	0,0725	0,0675	0,2100	0,2525
P-4	3	5	0,2849	0,1503	0,1500	0,2525	0,5300
E-10	4	5	0,1362	0,0270	0,1075	0,1362	0,1775
C-10	5	5	0,1820	0,0599	0,1125	0,1950	0,2475
P-10	6	5	0,2110	0,1069	0,0975	0,2500	0,3400
E-28	7	5	0,1970	0,0808	0,1000	0,1875	0,3250
C-28	8	5	0,0950	0,0602	0,0250	0,0800	0,1900
P-28	9	5	0,0890	0,0608	0,0400	0,0725	0,1950

*: tratamento **: tempo de sacrifício
': interação '': número de amostras

Os dados obtidos para cada variável foram submetidos à ANOVA e os resultados são apresentados a seguir na Tabela 4:

Tabela 4 – Resultados da ANOVA, referente aos dados de preenchimento da área da marcação por **epitélio**

Efeito	p
Tratamento	0,345
Tempo de sacrifício	0,008*
Interação	0,080

* p<0,05

A diferença estatística encontrada para a variável tempo de sacrifício, observada utilizando o teste ANOVA, foi submetida ao teste de comparação múltipla, ao nível de significância de 0,05 (Tabela 5).

Tabela 5 – Representação em ordem decrescente de médias de preenchimento da marcação por **epitélio**, que diferem significativamente, em relação à variável tempo de sacrifício, pelo teste de Tukey (5%)

TS*	Média	Grupos Homogêneos **	
4	0,2318	A	
10	0,1764	A	B
28	0,1270		B

*: tempo de sacrifício
**: letras iguais indicam diferença estatística não significativa

Os resultados mostram diferença estatisticamente significante entre as médias de preenchimento da marcação por epitélio, nos tempos de sacrifício quatro e vinte e oito dias. O tempo decorrido entre os períodos de sacrifício influenciou positivamente na porcentagem de preenchimento da marcação, uma vez que a quantidade de epitélio foi menor nos animais sacrificados com 28 dias, independente do tratamento realizado.

A Figura 7 ilustra os resultados da interação tratamento x tempo de sacrifício:

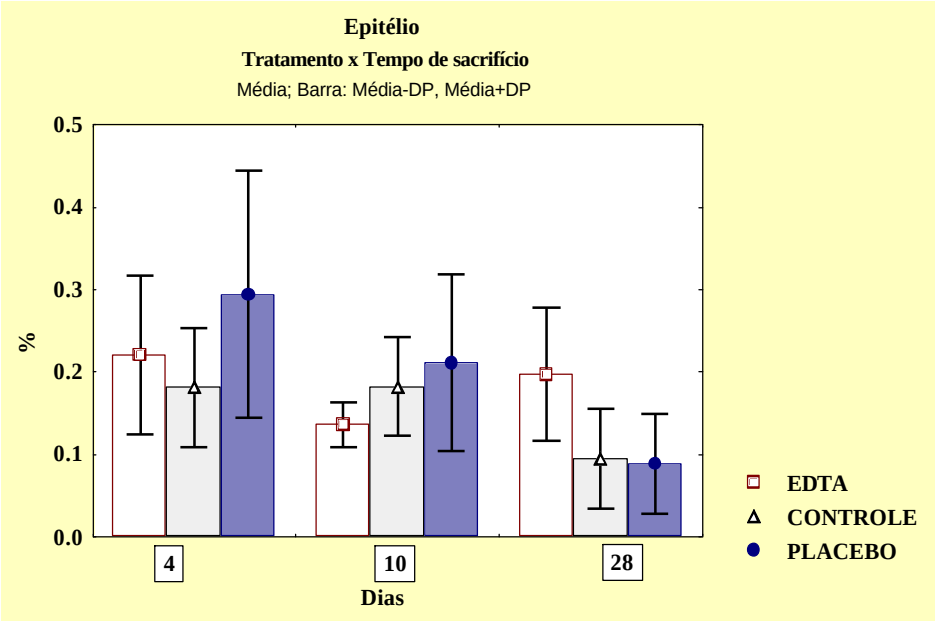

FIGURA 7- Gráfico de médias de preenchimento da marcação (%) por epitélio referente à interação entre tratamento e tempo de sacrifício

5.2.2 Tecido conjuntivo inflamado

As médias de porcentagem de preenchimento da marcação por tecido conjuntivo inflamado, estão apresentadas na Tabela 22 (apêndice B). No entanto, este tecido não foi observado no período de 28 dias, logo, constam para a análise estatística, apenas os tempo de sacrifício de quatro e dez dias. Os dados da estatística descritiva analisando a variável tratamento estão representados na Tabela 6.

Tabela 6 – Estatística descritiva dos dados referentes ao preenchimento da marcação (%) por **tecido conjuntivo inflamado** em relação ao tratamento

Tratamento	N*	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Mediana	Valor Máximo
E	10	0,1794	0,0528	0,1075	0,1634	0,2775
C	10	0,2490	0,0569	0,1550	0,2550	0,3625
P	10	0,2008	0,1120	0,0400	0,2000	0,4025

*: número de amostras

Os resultados da estatística descritiva analisando a variável tempo de sacrifício estão representados na Tabela 7

Tabela 7 – Estatística descritiva dos dados referentes ao preenchimento da marcação (%) por **tecido conjuntivo inflamado** em relação ao tempo de sacrifício

TS*	N**	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Mediana	Valor Máximo
4	10	0,2185	0,0923	0,0625	0,2275	0,4025
10	10	0,2010	0,0712	0,0400	0,2100	0,2925

*: tempo de sacrifício **: número de amostras

Os resultados observados na Tabela 8 representam a estatística descritiva das médias de porcentagem de preenchimento da marcação por tecido conjuntivo inflamado, considerando a variável interação entre o tratamento e o tempo de sacrifício.

Tabela 8 – Estatística descritiva dos dados referentes ao preenchimento da marcação (%) por **tecido conjuntivo inflamado** em relação à interação entre tratamento x tempo de sacrifício

Variável T*-TS**	I’	N’’	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Mediana	Valor Máximo
E-4	1	5	0,2000	0,0586	0,1375	0,2050	0,2775
C-4	2	5	0,2580	0,0764	0,1550	0,2525	0,3625
P-4	3	5	0,1975	0,1327	0,0625	0,1900	0,4025
E-10	4	5	0,1589	0,0422	0,1075	0,1500	0,2200
C-10	5	5	0,2400	0,0352	0,1775	0,2525	0,2600
P-10	6	5	0,2040	0,1030	0,0400	0,2100	0,2925

*: tratamento **: tempo de sacrifício

A tabela 9, representa os dados obtidos para cada variável após terem sido submetidos à ANOVA:

Tabela 9 – Resultados da ANOVA, referente aos dados de preenchimento da área da marcação por **tecido conjuntivo inflamado**

Efeito	p
Tratamento	0,1741
Tempo de sacrifício	0,5641
Interação	0,8119

Os resultados não mostram nenhuma diferença estatisticamente significante entre as variáveis analisadas. Os resultados podem ser melhor interpretados na Figura 8 que se segue:

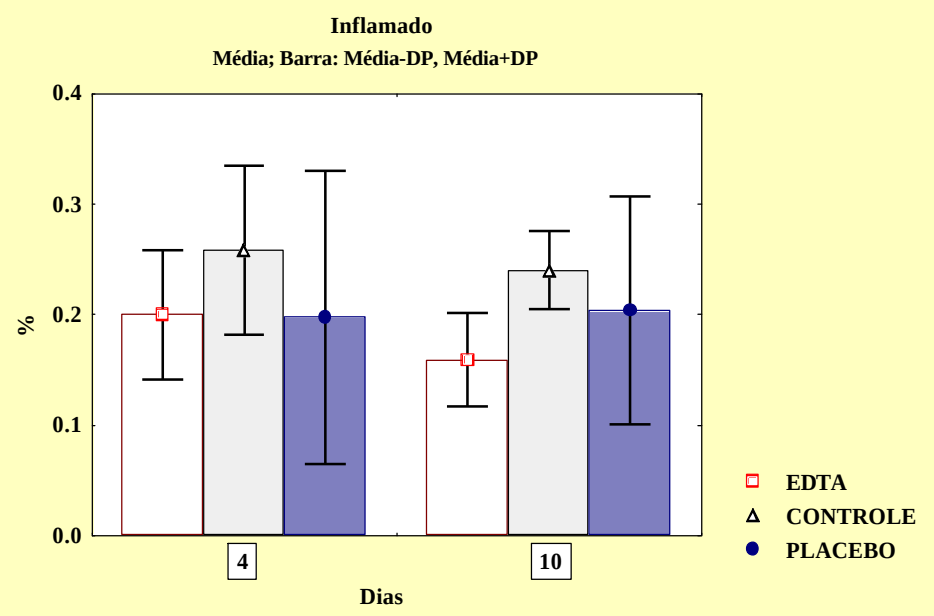

FIGURA 8 – Gráfico de médias de preenchimento da marcação (%) por tecido conjuntivo inflamado, referente à interação entre tratamento e tempo de sacrifício.

5.2.3 Tecido conjuntivo sadio

As médias de porcentagem de preenchimento da marcação por tecido conjuntivo normal, estão apresentadas na Tabela 23 (apêndice C). Os resultados observados na Tabela 10 representam a estatística descritiva das médias de porcentagem de preenchimento da marcação por tecido conjuntivo sadio, considerando a variável tratamento.

Tabela 10 - Estatística descritiva dos dados referentes ao preenchimento da marcação (%) por **tecido conjuntivo sadio** em relação à variável tratamento

Tratamento	N*	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Mediana	Valor Máximo
E	15	0,2585	0,1553	0,0000	0,2500	0,5500
C	15	0,2890	0,2672	0,0300	0,1600	0,8275
P	15	0,2510	0,2779	0,0000	0,0725	0,7625

*: número de amostras

Os dados da estatística descritiva analisando a variável tempo de sacrifício estão representados na Tabela 11.

Tabela 11 - Estatística descritiva dos dados referentes ao preenchimento da marcação (%) por **tecido conjuntivo sadio** em relação ao tempo de sacrifício

TS*	N**	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Mediana	Valor Máximo
4	15	0,0760	0,0643	0,2450	0,0725	0,2450
10	15	0,1725	0,1020	0,3400	0,1600	0,3400
28	15	0,5500	0,1567	0,8275	0,5675	0,8275

*: tempo de sacrifício
**: número de amostras

Na Tabela 12 estão descritos os dados da estatística descritiva, considerando a variável interação entre o tratamento e o tempo de sacrifício.

Tabela 12 - Estatística descritiva dos dados referentes ao preenchimento da marcação (%) por **tecido conjuntivo sadio** em relação à interação entre tratamento x tempo de sacrifício

Variável T*-TS**	I'	N''	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Mediana	Valor Máximo
E-4	1	5	0,1010	0,0891	0,0000	0,0825	0,2450
C-4	2	5	0,0850	0,0611	0,0300	0,0850	0,1775
P-4	3	5	0,0420	0,0225	0,0200	0,0450	0,0725
E-10	4	5	0,2490	0,0572	0,1900	0,2500	0,3400
C-10	5	5	0,1745	0,0905	0,1050	0,1400	0,3325
P-10	6	5	0,0940	0,0997	0,0000	0,0525	0,2575
E-28	7	5	0,4255	0,0847	0,3475	0,4250	0,5500
C-28	8	5	0,6075	0,2067	0,2825	0,6750	0,8275
P-28	9	5	0,6170	0,0831	0,5675	0,5725	0,7625

*: tratamento **: tempo de sacrifício
': interação '': número de amostras

Os valores obtidos para cada variável foram submetidos à ANOVA e os resultados estão apresentados a seguir na Tabela 13:

Tabela 13 – Resultados da ANOVA, referente aos dados de preenchimento da área da marcação por **tecido conjuntivo sadio**

Efeito	p
Tratamento	0,5515
Tempo de sacrifício	0,0000*
Interação	0,0059*

*: $p<0,05$

O tipo de tratamento realizado não interferiu no resultado final do preenchimento da marcação. Diferença estatisticamente significante foi encontrada nas variáveis tempo de sacrifício (Tabela 14) e interação (Tabela 15), quando se utilizou o teste ANOVA, logo, estes resultados foram submetidos ao teste de comparação múltipla, ao nível de significância de 0,05.

Tabela 14 – Representação em ordem decrescente de médias de preenchimento da marcação por **tecido conjuntivo sadio**, que diferem significativamente, em relação à variável tempo de sacrifício, pelo teste de Tukey (5%)

TS*	Média	Grupos Homogêneos **		
28	0,5500	A		
10	0,1725		B	
4	0,0760			C

*: tempo de sacrifício

Os resultados mostraram três médias estatisticamente diferentes, apresentadas em ordem decrescente. Indicando que o maior intervalo de tempo auxiliou para o melhor reparo da marcação, sendo encontrada portanto, maior quantidade de tecido conjuntivo sadio nos animais sacrificados com 28 dias.

Tabela 15 – Representação em ordem decrescente de médias de preenchimento da marcação por **tecido conjuntivo sadio**, que diferem significativamente, em relação à variável interação entre tratamento x tempo de sacrifício, pelo teste de Tukey (5%)

T*	TS**	Média	Grupos Homogêneos***		
P	28	0,6170	A		
C	28	0,6075	A		
E	28	0,4255	A	B	
E	10	0,2490		B	C
C	10	0,1745			C
E	4	0,1010			C
P	10	0,0940			C
C	4	0,0850			C
P	4	0,0420			C

*: tratamento **: tempo de sacrifício
***letras iguais indicam diferença estatística significante

Estes resultados mostram que os animais sacrificados em 28 dias têm média semelhante entre si, independente do tipo de tratamento realizado, contudo, o grupo tratado com EDTA e sacrificado

no período de dez dias, tem média similar ao grupo tratado com EDTA no período de 28 dias.

A Figura 9 abaixo ilustra o comportamento dos dados, para a variável interação entre tratamento e tempo de sacrifício:

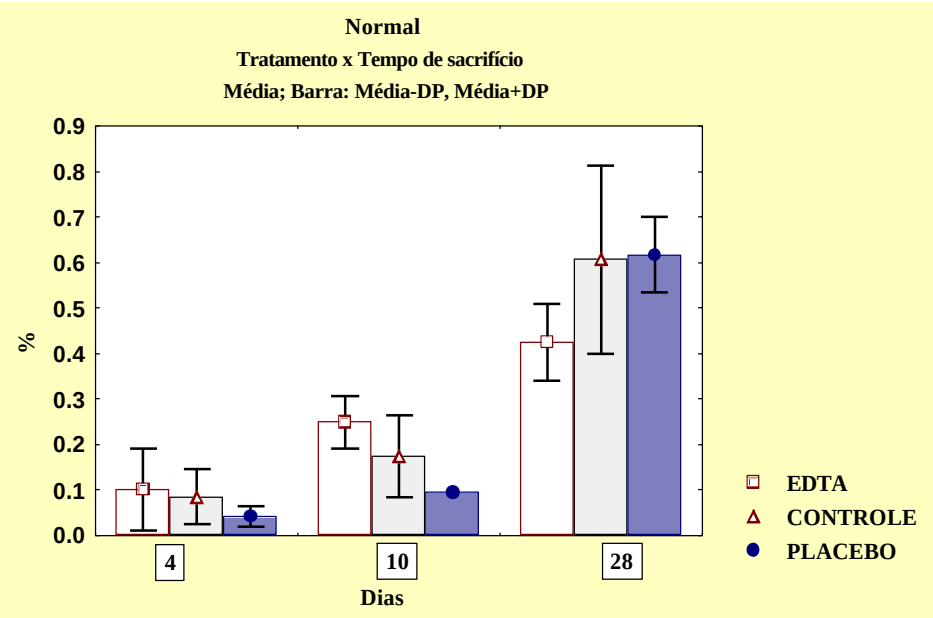

FIGURA 9 - Gráfico de médias de preenchimento da marcação (%) por tecido conjuntivo sadio, referente à interação entre tratamento x tempo de sacrifício

5.2.4 Preenchimento total da área

Dando seqüência ao estudo histomorfométrico, os tecidos epitelial, conjuntivo inflamado e conjuntivo sadio, foram somados a fim de se obter a porcentagem de preenchimento total da marcação, as médias estão apresentadas na Tabela 24 (apêndice D). Os dados da estatística descritiva analisando a variável tratamento estão representados na Tabela 16.

Tabela 16 - Estatística descritiva dos dados referentes ao **preenchimento total** da marcação (%) em relação ao tratamento

Tratamento	N*	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Mediana	Valor Máximo
E	15	0,5680	0,0822	0,4175	0,5575	0,7225
C	15	0,6081	0,1373	0,3975	0,6150	0,8525
P	15	0,5805	0,1267	0,3500	0,5850	0,8350

*: número de amostras

Os resultados da estatística descritiva analisando a variável tempo de sacrifício estão representados na Tabela 17.

Tabela 17 - Estatística descritiva dos dados referentes ao **preenchimento total** da marcação (%) em relação ao tempo de sacrifício

TS*	N**	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Mediana	Valor Máximo
4	15	0,5267	0,0897	0,3975	0,5200	0,6850
10	15	0,5540	0,0922	0,3500	0,5650	0,7575
28	15	0,6758	0,1119	0,4725	0,6450	0,8525

*: tempo de sacrifício **: número de amostras

Na Tabela 18 estão descritos os valores da estatística descritiva, considerando a variável interação entre o tratamento e o tempo de sacrifício.

Tabela 18 - Estatística descritiva dos dados referentes ao **preenchimento total** da marcação (%) em relação à interação entre tratamento e tempo de sacrifício

Variável T*-TS**	I'	N''	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Mediana	Valor Máximo
E-4	1	5	0,5215	0,0987	0,4175	0,5200	0,6725
C-4	2	5	0,5252	0,1047	0,3975	0,5160	0,6850
P-4	3	5	0,5335	0,0859	0,4000	0,5725	0,6125
E-10	4	5	0,5625	0,0411	0,5175	0,5625	0,6225
C-10	5	5	0,5965	0,1075	0,4925	0,6150	0,7575
P-10	6	5	0,5030	0,1043	0,3500	0,5650	0,5950
E-28	7	5	0,6200	0,0782	0,5350	0,6125	0,7225
C-28	8	5	0,7025	0,1535	0,4725	0,7550	0,8585
P-28	9	5	0,7050	0,0911	0,6350	0,6450	0,8350

*.: tratamento **: tempo de sacrifício
': interação '': número de amostras

Os dados obtidos para cada variável foram submetidos à ANOVA e os resultados são apresentados a seguir na Tabela 19.

Tabela 19 – Resultados da ANOVA, referente aos dados de **preenchimento total** da área da marcação

Efeito	p
Tratamento	0,5389
Tempo de sacrifício	0,0005*
Interação	0,5106

* p<0,05

A diferença estatística encontrada para a variável tempo de sacrifício, observada utilizando o teste ANOVA, foi submetida ao teste de comparação múltipla, ao nível de significância de 0,05 (Tabela 20).

Tabela 20 – Representação em ordem decrescente de médias de **preenchimento total** da marcação, que diferem significativamente, em relação à variável tempo de sacrifício, pelo teste de Tukey (5%)

TS*	Média	Grupos Homogêneos **	
28	0,6758	A	
10	0,5540		B
4	0,5267		B

*: tempo de sacrifício
**: letras iguais indicam diferença estatística não significativa

Os resultados mostram que o tempo decorrido influenciou positivamente a porcentagem de preenchimento total da marcação. Observe os dados na Figura 10:

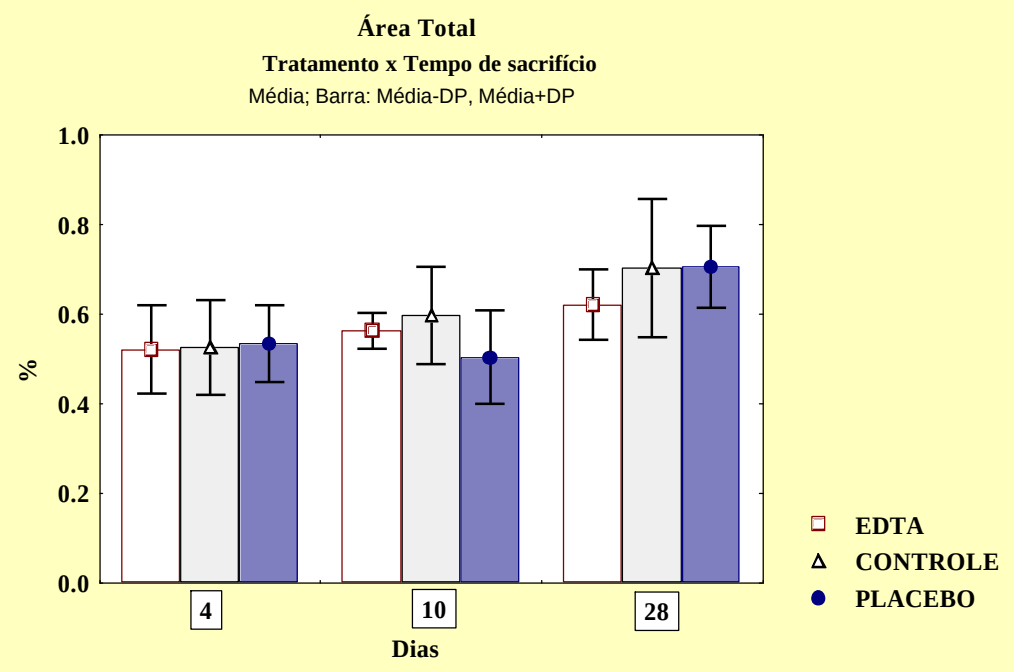

FIGURA 10 - Gráfico de médias do preenchimento total da marcação (%), considerando a interação entre tratamento e tempo de sacrifício

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho, o gel de EDTA a 24% pH 7,0 foi avaliado quanto à sua eficiência em melhorar o reparo tecidual em procedimentos periodontais não cirúrgicos.

Um dos principais objetivos da terapia periodontal é restaurar arquitetura e função do periodonto destruído, isto é, obter nova formação de osso, cemento e ligamento periodontal (Fernyhough & Page[25] , 1983; Fardal & Lowenberg[24], 1990; Biagini et al.[10], 1992; Babay[5], 2000; Babay[6], 2001; Kawaguchi et al.[37], 2001). O resultado final da cicatrização periodontal, depende do tipo celular que repovoa a área da ferida, sendo que as células do ligamento periodontal possuem importante papel na regeneração do periodonto (Melcher[51], 1976). Contudo, a regeneração não é o resultado final mais comum; na maioria dos casos, o epitélio prolifera apicalmente mais rápido que os outros tecidos, formando o epitélio juncional longo (Melcher[51], 1976; Polson & Caton[59], 1982; Karring et al.[36], 1993), estando de acordo com o nosso estudo em que todos os animais avaliados apresentaram a reparação periodontal pela formação do epitélio juncional longo.

Todo tratamento periodontal visa tornar a superfície radicular biocompatível com as células do tecido conjuntivo, para que ocorra a reinserção dos tecidos periodontais perdidos (Bogle et al.[22], 1981; Escher & Rapley[23], 1991), assim muitos estudos têm investigado os efeitos da instrumentação radicular (Aleo et al.[4], 1974; Register & Burdick[65], 1975; Lasho et al.[40], 1983; Escher & Rapley[23], 1991).

A raspagem e o aplainamento radicular são realizados no intuito de remover depósitos bacterianos, cálculos e camadas superficiais

das raízes como cemento e dentina, que podem ser considerados depósitos de toxinas bacterianas (Aleo et al.[3], 1975; Adriaens et al.[1], 1988; Adriaens et al.[2], 1988; Biagini et al.[10], 1992). No entanto, após a instrumentação da superfície radicular, áreas de cemento contaminado (Adriaens et al.[1], 1988; Adriaens et al.[2], 1988), bem como a *smear layer* formada durante o procedimento de raspagem (Polson et al.[63], 1984) podem permanecer sobre a área tratada, interferindo no processo de reparação periodontal. A *smear layer* consiste de debris orgânicos e mineralizados, que podem produzir efeito negativo nas células do tecido periodontal, inibindo talvez a nova inserção (Polson et al. [63], 1984; Blomlöf & Lindskog[12], 1995).

Assim, o tratamento químico adicional das raízes, como o condicionamento com ácido cítrico (Register & Burdick[65], 1975; Register & Burdick[66], 1976; Polson & Proye[61], 1983; Hanes et al.[29], 1988; Babay[5], 2001), ácido fosfórico (Blomlöf & Lindskog[12], 1995; Blomlöf & Lindskog[13], 1995; Blomlöf[11], 1996; Fardal & Lowenberg[24], 1990), tetraciclina (Mattson et al.[49], 1999; Babay[5], 2000; Isik et al.[34], 2000; Babay[6], 2001) e EDTA (Blomlöf et al.[14], 1997; Mayfield et al.[50], 1998; Blomlöf et al.[19], 2000; Blomlöf et al.[20], 2000; Babay[6], 2001; Pilatti[57], 2001) é preconizado para remover a *smear layer* e tornar a superfície radicular novamente biocompatível com as células do periodonto. Todos estes condicionadores ácidos podem ser aplicados em solução ou gel, porém, o preparo em gel, dá maior possibilidade de controle da ação do agente ácido (Blomlöf et al.[18], 2000).

Superfícies radiculares acometidas por doença periodontal parecem ser hipermineralizadas e podem estar contaminadas com patógenos periodontais e endotoxinas dentro do cálculo dental e cemento radicular (Aleo et al. [4], 1974; Adriens et al. [2], 1988). Estes aspectos tornam a superfície radicular incompatível com as células associadas com a reparação periodontal (Aleo et al.[3], 1975; Polson & Caton[59], 1982), pois os microrganismos presentes na dentina radicular

podem contribuir para as falhas de terapias periodontais e recorrência da doença, por tornarem a superfície imprópria ao restabelecimento do cemento, ligamento periodontal e osso alveolar, originalmente destruídos (Aleo et al.[3], 1975; Jones & O'Leary[35], 1978; Adriens et al.[2], 1988). Estes estudos sugerem que se realize a remoção excessiva do cemento para que se obtenha uma superfície livre de endotoxinas bacterianas.

Por outro lado, Hugles & Smales[32] (1990) avaliando a concentração de LPS no cemento, concluíram que o significado clínico deste foi super enfatizado no passado e que o aplainamento radicular excessivo não é justificável (Babay[6], 2001). Em 1992, Hugles & Smales[32] afirmaram que existem muitos outros aspectos que interferem na reparação periodontal além do LPS, como a adsorção de glicoproteínas salivares, mineralização do cemento e a produção de outras toxinas bacterianas. Ökte et al.[55] (1999) concordam com os estudos acima, pois concluíram em seu estudo com LPS, que este se localiza nas camadas superficiais do cemento e também observaram que a concentração de LPS ligado ao cemento foi inferior às concentrações utilizadas em outros estudos (Aleo et al. [4], 1974; Jones & O'Leary[35], 1978; Adriens et al.[1], 1988).

A principal função do condicionamento ácido é, portanto, dissolver a *smear layer*, remover áreas mineralizadas da superfície radicular e expor fibras colágenas. No entanto, estes objetivos serão atingidos dependendo do tempo e agente utilizado (Lasho et al.[40], 1983; Bergenholtz & Babay[9], 1998). Segundo Lowenguth & Blienden[46] (1993), a desmineralização da superfície radicular pode prover um substrato mais favorável à adesão celular, porém, esta superfície apresenta variações na concentração de cálcio, magnésio e fósforo, conseqüentemente, sua desmineralização pode estar sujeita a falhas em alguns locais mais resistentes (Hennequim & Douillard[30], 1995).

Diversos estudos têm relatado que o condicionamento ácido da superfície radicular também pode melhorar a inserção do tecido

conjuntivo (Lasho et al.[40], 1983; Polson et al.[63], 1984; Polson[58], 1986; Blomlöf et al.[18], 1996; Babay[6], 2001) e a aderência de fatores de crescimento e substâncias biologicamente ativas (Mayfield et al.[50], 1998). Este aspecto favorável é conseqüência da desintoxicação da raiz exposta a periodontite (Adriaens et al.[2], 1987), remoção da camada de *smear layer* (Polson et al.[63], 1984; Blomlöf et al.[14], 1997; Blomlöf et al.[15], 1997) e exposição das fibras colágenas pela ação desmineralizadora do ácido (Polson[58], 1986; Blomlöf et al.[16], 1997; Blomlöf et al.[18], 1997).

O modelo experimental do nosso estudo consistiu na inserção de ligadura ao redor do segundo molar superior esquerdo de ratos, a fim de induzir doença periodontal localizada, para posterior análise do efeito do gel de EDTA na reparação. Estudos prévios demonstraram que os tratamentos periodontais que resultam em regeneração, podem ser comprovados histologicamente em modelos animais (Listgarten[45], 1975; Lindhe & Ericsson[41], 1978; Klausen[38], 1991; Selvig[71], 1994; Weinberg & Bral[80], 1999; Wikesjö & Selvig[81], 1999). O rato possui periodonto semelhante ao do homem (Klausen[38], 1991; Listgarten[45], 1975), sendo a patogênese da doença periodontal, fenômenos biológicos básicos (Weinberg & Bral[80], 1999; Wikesjö & Selvig[81], 1999) e microorganismos periodontopatogênicos (Klausen[38], 1991) também similares ao do ser humano. Esses aspectos possibilitam a indução da doença periodontal, como demonstrou o estudo de Lindhe & Ericsson[41] (1978), comprovando que a presença da ligadura, além de iniciar o desenvolvimento da gengivite, promoveu uma rápida destruição dos tecidos periodontais de suporte. No entanto, a efetividade da doença periodontal induzida foi questionada por Bogle et al.[22] (1981) que concluíram haver mais sucesso das terapias periodontais em sítios em que a doença foi induzida do que nos sítios em que a doença se desenvolveu naturalmente. Por outro lado, Selvig[71] (1994) contestou o estudo acima, afirmando que o resultado do tratamento independe do modo como a doença se instala. Neste presente estudo, a doença

periodontal foi induzida com sucesso, uma vez que se observou grande perda óssea nos molares, mobilidade dentária, envolvimento de furca, reabsorção dos septos interradiculares e da crista óssea, além da presença de infiltrado inflamatório. Contudo, não foi realizada a comparação dos resultados em sítios com doença induzida ou natural.

Nos modelos animais há vantagens adicionais para o desenvolvimento de estudos, como o fato de poder-se realizar marcações, no intuito de se padronizar a área em que o reparo periodontal será avaliado por meio de análise histológica e/ou histomorfométrica (Nalbandian & Cote[52], 1982; Socranski et al.[75], 1984; Smith et al.[73], 1987; Mayfield et al.[50], 1998; Ökte et al.[55], 1999). Em nosso estudo, as raízes do segundo molar superior esquerdo dos animais foram desgastadas com lima Hedströen n°15, realizando-se sempre vinte movimentos vestíbulo-linguais na região de maior profundidade de bolsa. Tal marcação foi importante para padronizar o local a ser analisado, no entanto, não proporcionou as mesmas características a todas as marcações. Ricardo[67] (2002), relatou que as variações entre as marcações se devem às diferentes profundidades da bolsa periodontal e pequenas alterações no longo eixo das raízes, as quais modificavam a direção da inserção da lima e, conseqüentemente, a morfologia do desgaste, corroborando com os resultados do nosso trabalho que também mostraram grande variação entre as marcações.

Neste presente estudo, a análise histométrica ao microscópio óptico, foi realizada com um retículo de cem pontos, alinhado no vértice da marcação (Greenstein et al.[28], 1981; Ling et al.[43], 1994), permitindo que esta fosse totalmente incluída no campo do retículo. Foi interessante notar neste trabalho, a freqüente ocorrência de fendas no epitélio e entre o epitélio e a superfície radicular, porém, segundo Listgarten[44] (1972), estas fendas parecem ser conseqüência do processamento técnico do material, uma vez que ocorrem tanto no grupo experimental quanto no controle. Outro aspecto importante a ser

ressaltado no nosso trabalho é o fato de que apesar de todos os animais terem permanecido pelo mesmo tempo com a ligadura em posição, alguns desenvolveram uma doença mais agressiva que outros. Estes resultados estão de acordo com os de Listgarten[44] (1972), que relatou em seu estudo com ratos, que a severidade da gengivite e a sua distribuição variam entre os animais.

No presente estudo não foi encontrada diferença estatisticamente significante quanto ao resultado final da reparação periodontal entre os grupos experimentais (placebo e EDTA) e entre estes e o grupo controle. Ocorreu diferença estatística significativa quando se analisou a variável tempo de sacrifício e, em algumas análises da interação tratamento x tempo de sacrifício, porém, não houve influência no resultado final. Em nenhum dos modelos animais foi observada formação de novo cemento, osso ou ligamento periodontal.

Pudemos observar que os animais sacrificados em quatro dias, independente do tratamento a que foram submetidos, apresentaram maior quantidade de epitélio preenchendo a marcação do que os animais sacrificados em 28 dias. No período de quatro dias, notou se aumento da espessura total deste tecido, grande quantidade de projeções epiteliais e migração apical do epitélio, enquanto no período de 28 dias verificou se mínimo espessamento do epitélio, escassas projeções e migração apical na forma de uma projeção fina e alongada. Concluímos, portanto, que a medida que se aumentou o prazo do tempo de sacrifício, diminuiu a quantidade de epitélio que preenchia a marcação.

Não foi observado tecido conjuntivo inflamado nos animais sacrificados com 28 dias, portanto, quando se realizou a análise estatística para a variável tempo de sacrifício, apenas os prazos de quatro e dez dias foram incluídos. Os resultados mostraram que independente do tratamento e do tempo de sacrifício, não houve diferença estatística entre os grupos. No entanto, é claro que houve

grande diferença entre os animais sacrificados em quatro dias, os quais apresentaram moderado infiltrado inflamatório com neutrófilos e macrófagos e aqueles sacrificados em 28 dias, em que apenas se verificavam raras células inflamatórias, compatíveis com periodonto normal. É importante ressaltar que apesar de não ter sido encontrada diferença estatisticamente significante, a menor média de preenchimento da marcação por tecido conjuntivo inflamado foi verificada no grupo tratado com EDTA.

A análise histomorfométrica do tecido conjuntivo sadio foi diferente estatisticamente, não apenas entre todos os períodos de sacrifício, mas também na interação entre tempo de sacrifício e tratamento. A grande diferença observada em relação à variável tempo de sacrifício, além de maior porcentagem de tecido conjuntivo sadio aos 28 dias, foi a organização das fibras colágenas, que apresentavam maior tendência à orientação paralela ao longo eixo do dente. Quando se analisou a interação, verificou-se que no período de 28 dias, todas as médias foram similares em todos os tratamentos. Portanto, o maior intervalo entre o tratamento e o tempo de sacrifício, influenciou positivamente o aumento da porcentagem de tecido conjuntivo sadio presente na área da marcação, independente do tratamento realizado. Sendo assim, a quantidade de tecido conjuntivo sadio foi maior, em ordem decrescente nos animais sacrificados com 28, dez e quatro dias.

Com relação à quantidade de preenchimento total da marcação, houve diferença estatisticamente significante entre os grupos sacrificados com quatro e 28 dias independentemente do tratamento a que foram submetidos. Além da marcação estar mais preenchida aos 28 dias, o tecido de preenchimento também era diferente, uma vez que houve diferença estatística na porcentagem de epitélio, tecido conjuntivo inflamado e tecido conjuntivo sadio entre os prazos de quatro e 28 dias. Com quatro dias, o tecido era composto por maior quantidade de epitélio e tecido conjuntivo inflamado e menor quantidade de tecido conjuntivo

sadio, enquanto aos 28 dias observou-se menor quantidade de epitélio, ausência de tecido conjuntivo inflamado e grande quantidade de tecido conjuntivo sadio.

A reparação de um defeito periodontal após cirurgia a retalho é conceitualmente um processo mais complexo do que a cicatrização de feridas em outros locais do corpo (Melcher[51], 1976; Wikesjö et al.[83], 1991; Wikesjö et al.[82], 1992), pois há fatores críticos no processo de reparação periodontal como a desmineralização da superfície radicular (Polson et al.[62], 1986; Register & Burdick[66], 1976), adaptação do tecido (Register & Burdick[66], 1976) e eventos iniciais no processo de cura (Polson et al.[62], 1986; Polson & Proye[61], 1983).

Segundo Wikesjö et al.[83] (1991), a seqüência cronológica dos eventos para a reparação do periodonto, após o condicionamento radicular com ácido cítrico é similar à do dente natural. Um dos primeiros eventos a ocorrer é a formação da rede de fibrina associada com algumas células inflamatórias. Seqüencialmente, ocorre a fase de proliferação dos fibroblastos e áreas de tecido conjuntivo celular com escassas células inflamatórias (Wikesjö et al.[83], 1991). A cronologia descrita acima está de acordo com o nosso estudo, uma vez que a rede de fibrina foi observada principalmente nos animais sacrificados com quatro dias e, por vezes, verificada no período de dez dias, estando ausente aos 28 dias. A presença de maior porcentagem de células inflamatórias nos estágios iniciais da reparação também se assemelha aos nossos resultados, havendo redução desta quantidade com o decorrer do tempo.

O condicionamento da superfície radicular com EDTA a 24%, pH neutro, promove a remoção seletiva do material mineralizado, expondo, portanto, as fibras colágenas. Assim, o EDTA consegue facilitar a formação e aderência do coágulo sangüíneo à superfície radicular e favorecer a colonização celular com subseqüente formação de tecido conjuntivo (Blomlöf & Lindskog[13], 1995; Blomlöf et al.[15], 1996; Blomlöf et

al.[18], 1996; Blomlöf et al.[21], 1996). Por outro lado, quando as superfícies são condicionadas com substâncias de pH baixo, sofrem remoção da parte mineral e da matriz colágena, além de necrose das células do ligamento periodontal adjacente (Blomlöf & Lindskog[12], 1995; Blomlöf & Lindskog[13], 1995; Blomlöf[11], 1996) e se aplicadas por tempo maior que 3 minutos aumentam a recessão gengival e interferem na reparação óssea (Blomlöf et al.[17], 1995).

Nossos resultados da análise histológica mostraram vacuolização e necrose em algumas células apenas na camada superficial do epitélio, porém, este fato também ocorreu no grupo controle e placebo, demonstrando que o gel de EDTA não produziu necrose adicional de células. Portanto, podemos afirmar que a vitalidade dos tecidos periodontais circunjacentes não é alterada pela aplicação do gel de EDTA, concordando com estudos prévios de Blomlöf & Lindskog[12] (1995) e Blomlöf et al.[18] (1996).

No presente estudo, a adesão dos fibroblastos à superfície radicular, não sofreu influência do agente condicionante, entretanto, segundo Zaman et al.[84] (2000) e Babay[6] (2001), a aderência e orientação de células do ligamento periodontal humano *in vitro*, são alteradas pelo fato da superfície estar ou não condicionada, independente do pH das substâncias condicionadoras. Os ácidos produzem modificações bioquímicas nos túbulos dentinários que aumentam a adesão dos fibroblastos, estas modificações podem ser conseqüências diretas, como a exposição de constituintes da matriz extracelular que agem no mecanismo de aderência dos fibroblastos ou indiretas pela fixação aumentada dos fatores bioquímicos às superfícies desmineralizadas (Babay[6], 2001).

Os estudos que avaliaram o EDTA quanto à sua eficiência em melhorar as condições da superfície radicular para a obtenção de nova inserção *in vitro*, foram unânimes em concordar que ele remove a *smear layer*, expõe seletivamente fibras colágenas e auxilia

na aderência de fibroblastos (Lasho et al.[40], 1983; Fardal & Lowenberg[24], 1990; Blomlöf et al.[14], 1997; Blomlöf et al.[15], 1997; Bergenholtz & Babay[9], 1998; Sampaio[68], 1999; Zaman[84], 2000; Pillati[57], 2001). Todos os trabalhos que avaliaram o gel de EDTA como coadjuvante ao procedimento periodontal cirúrgico ou não cirúrgico, utilizando o MEV, verificaram sua eficácia na remoção da *smear layer* associada à superfície radicular e exposição de fibras colágenas (Blomlöf[11], 1996; Blomlöf et al.[21], 1996; Babay[5], 2000).

Contudo, no nosso estudo e no estudo de Blomlöf et al.[19] (2000) em que o gel de EDTA foi avaliado como coadjuvante ao procedimento periodontal não cirúrgico por meio de análise histomorfométrica e análise clínica, respectivamente, os resultados mostraram que não há diferença estatisticamente significante entre o grupo controle e o grupo condicionado com EDTA, concluindo que o EDTA não promove nova inserção. No entanto, Blomlöf et al.[18] (1996) avaliando o EDTA como auxiliar ao procedimento cirúrgico, por meio de análise histomorfométrica, concluíram que este é capaz de produzir uma superfície mais biocompatível para conduzir tecidos periodontais, sem comprometer a vitalidade do periodonto circunjacente. Os autores observaram ganho de inserção e menor recessão gengival no grupo condicionado com EDTA, quando comparado ao grupo controle ou grupo condicionado com ácido cítrico. Por outro lado, Blomlöf et al.[20] (2000) e Mayfield et al.[50] (1998), avaliando o gel de EDTA também como auxiliar em terapias cirúrgicas, porém, por meio de mensurações clínicas, não verificaram diferença estatisticamente significante com relação ao ganho de inserção clínica, entre os grupos experimental e controle.

Com relação ao ácido cítrico, diversos trabalhos mostraram que o condicionamento radicular com este ácido produz inibição da migração epitelial (Polson et al.[62], 1986; Polson & Hanes[60], 1987; Hanes et al.[29], 1988), entretanto, estes estudos utilizaram modelos experimentais muito diferentes da condição real de aplicação dos ácidos.

Os fragmentos de raízes de dentes humanos, após serem condicionados com ácido cítrico eram implantados no dorso de ratos, com uma das extremidades exteriorizada, simulando a situação transgengival do dente, porém, o ambiente do experimento era completamente distinto do meio ambiente bucal, tornado difícil a comparação com a situação clínica.

Segundo Blomlöf et al.[21] (1996), o EDTA é um agente quelante de cátions divalentes, que esgota o cálcio livre do meio. Durante a terapia periodontal não cirúrgica, a superfície radicular inevitavelmente torna-se coberta com uma mistura de sangue e debris da raspagem, que formarão a *smear layer*. O sangue por sua vez, contém cátions divalentes, primariamente Ca^{2+}, que podem impedir o EDTA de atuar seletivamente sobre a superfície radicular, para promover a exposição das fibras colágenas. Outro aspecto a ser abordado é que a eficácia do gel de EDTA em procedimento não cirúrgico depende do seu local de aplicação. Blomlöf et al.[16] (1997), verificaram que quando o gel de EDTA era associado a uma ponta de ultra-som modificada, o operador conseguia aplicar o mesmo na região subgengival, portanto não se limitava apenas à área cervical e o condicionamento era mais eficiente. Neste presente estudo, o gel foi aplicado através de uma seringa de ponta fina, tentando-se atingir toda a extensão da bolsa periodontal, porém, não se pode afirmar que o gel penetrou e permaneceu por 2 minutos na região mais profunda da bolsa. A razão pela qual o gel deve ser aplicado na região mais apical possível é que a bolsa periodontal geralmente é preenchida por exsudato e o gel aplicado com a ponta convencional não é capaz de transpor este volume de exsudato (Blomlöf et al.[16], 1997). Além disso, após o condicionamento com EDTA nos procedimentos não cirúrgicos, possíveis remanescentes de placa subgengival após a raspagem radicular parecem ser pouco alterados pelo ácido, talvez pelo fato de ficarem pouco tempo expostos ao EDTA, assim, interferem negativamente na reparação periodontal (Blomlöf & Lindskog[13], 1995; Blomlöf[11], 1996).

Os resultados deste trabalho falharam em demonstrar algum benefício do uso do EDTA como coadjuvante a procedimentos não cirúrgicos. O tecido que preencheu a marcação realizada na superfície radicular foi semelhante entre todos os tipos de tratamento, sendo influenciado positivamente pelo aumento do intervalo entre o tratamento e o tempo de sacrifício. Portanto, o condicionamento ácido das superfícies radiculares com gel de EDTA a 24% pH 7 durante 2 minutos, não contribuiu para o ganho de inserção, quando associado com a terapia periodontal não cirúrgica.

7 CONCLUSÃO

A análise dos resultados avaliados por meio de histologia descritiva e histomorfometria, tornou possível concluir que:

a) o gel de EDTA não modifica os eventos de reparação dos tecidos periodontais;
b) o tecido periodontal obtido como resultado final da cicatrização da ferida, foi semelhante em todos os grupos;
c) o condicionamento da superfície radicular com gel de EDTA a 24%, pH 7,0, como coadjuvante ao procedimento de raspagem e aplainamento radicular, não melhora o reparo dos tecidos periodontais, em doença periodontal induzida em ratos.

8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA*

1 ADRIAENS, P.A.; DE BOEVER, J.A.; LOESCHE, W.J. Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. **J Periodontol**, v.59, n.4, p.222-30, Apr. 1988.

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

3 ALEO, J.J; De RENZIS, F.A.; FABER P.A. In vitro attachment of human gingival fibroblasts to root surfaces. **J Periodontol**, v.46, n.11, p.639-46, Nov. 1975.

4 ALEO, J.J. et al. The presence and biologic activity of cementum-bound endotoxin. **J Periodontol**, v.45, n.9, p.672-5, Sept. 1974.

5 BABAY, N. Comparative SEM study on the effect of root conditioning with EDTA or tetracycline HCl on periodontally involved root surfaces. **Indian J Dent Res**, v.11, n.2, p.53-7, June 2000.

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

_____

Baseado em: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Informação e documentação**: referências, elaboração, NBR 6023. Rio de Janeiro, 2000. 22p.

7 BACKER, P.J. et al. An in vitro screening model to evaluate root conditioning protocols for periodontal regenerative procedures. **J Periodontol**, v.71, n.7, p.1139-43, July 2000.

8 BEERTSEN, W. et al. Generalized cervical root resorption associated with periodontal disease. **J Clin Periodontol**, v.28, n.11, p.1067-73, Nov. 2001.

9 BERGENHOLTZ, A.; BABAY, N. Scanning electron microscopy of the root surface texture of extracted periodontally diseased teeth following various etching and chelating regimens. **Int J Periodont Rest Dent**, v.18, n.2, p.171-9, 1998.

10 BIAGINI, G. et al. In vitro growth of periodontal fibroblasts on treated cementum. **Quintessence Int**, v.23, n.5, p.335-40, 1992.

11 BLOMLÖF, J. Root cementum appearance in healthy monkeys and periodontitis-prone patients after different etching modalities. **J Clin Periodontol**, v.23, n.1, p.12-8, Jan. 1996.

12 BLOMLÖF, J.; LINDSKOG, S. Periodontal tissue-vitality after different etching modalities. **J Clin Periodontol**, v.22, p.464-8, 1995.

13 BLOMLÖF, J.; LINDSKOG, S. Root surface texture and early cell and tissue colonization after different etching modalities. **Eur J Oral Sci**, v.103, n.1, p.17-24, Feb. 1995.

14 BLOMLÖF, J.; BLOMLÖF, L.; LINDSKOG, S. Effect of different concentrations of EDTA on smear removal and collagen exposure in periodontitis-affected root surfaces. **J Clin Periodontol**, v.24, n.8, p.534-7, Aug. 1997.

15 BLOMLÖF, J.; BLOMLÖF, L.; LINDSKOG, S. Smear layer formed by different root planing modalities and its removal by an ethylenediaminetetraacetic acid gel preparation. **Int J Periodont Rest Dent**, v.17, n.3, p.243-9, 1997.

16 BLOMLÖF, J.; BLOMLÖF, L.; LINDSKOG, S. Ultrasonic subgingival root planing and EDTA etching in a one-step procedure. **Swed Dent J** v.21, p.213-9, 1997.

17 BLOMLÖF, L. et al. Long-time etching at low pH jeopardizes periodontal healing. **J Clin Periodontol**, v.22, n.6, p.459-63, June 1995.

18 BLOMLÖF, J. et al. Root surface etching at neutral pH promotes periodontal healing. **J Clin Periodontol**, v.23, n.1, p.50-5, Jan. 1996.

19 BLOMLÖF, L. et al. A clinical study of root surface conditioning with an EDTA gel. I. Nonsurgical periodontal treatment. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v.20, n.6, p.561-5, 2000.

20 BLOMLÖF, J. et al. A clinical study of root surface conditioning with an EDTA gel. II. Surgical periodontal treatment. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v.20, n.6, p.567-73, 2000.

21 BLOMLÖF, J.P.S.; BLOMLÖF, L.B.; LINDSKOG, S.F. Smear removal and collagen exposure after non-surgical root planing followed by etching with an EDTA gel preparation. **J Periodontol**, v.67, n.9, p.841-5, Sept. 1996.

22 BOGLE, G. et al. New attachment after surgical treatment and acid conditioning of roots in naturally occurring periodontal disease in dogs. **J Periodontal Res**, v.16, n.1, p.130-3, Jan. 1981.

23 ESCHLER, B.M.; RAPLEY, J.W. Mechanical and chemical root preparation in vitro: efficiency of plaque and calculus removal. **J Periodontol**, v.62, n.12, p.755-60, Dec. 1991.

24 FARDAL, O; LOWENBERG, B.F. A quantitative analysis of the migration, attachment, and orientation of human gingival fibroblasts to human dental root surfaces *in vitro*. **J Periodontol**, v.61, n.8, p.529-35, Aug. 1990.

25 FERNYHOUGH, W. and PAGE, R.C. Attachment, growth and synthesis by human gingival fibroblasts on desmineralized or fibronectin-treated normal and diseased tooth roots. **J Periodontol**, v.54, n.3, p.133-40, Mar. 1983.

26 FRIESEN, L.R. et al. Controlled local delivery of tetracycline with polymer strips in the treatment of periodontitis. **J Periodontol**, v.73, n.1, p.13-9, Jan. 2002.

27 GARRETT, S. Periodontal regeneration around natural teeth. **Ann Periodontol**, v.1, n.1, p.621-66, Nov. 1996.

28 GREENSTEIN, G.; CATON, J.; POLSON, A.M. Histologic characteristic associated with bleeding after probing and visual signs of inflammation. **J Periodontol**, v.52, n.8, p.420-5, Aug. 1981.

29 HANES, P.J.; POLSON, A.M.; FREDERICK, G.T. Initial wound healing attachments to desmineralized dentin. **J Periodontol**, v.59, n.3, p.176-83, Mar. 1988.

30 HENNEQUIN, M.; DOUILLARD, Y. Effects of citric acid treatment on the Ca, P and Mg contents of human dental roots. **J Clin Periodontol**, v.22, n.7, p.550-7, July 1995.

31 HILLMANN, G. et al. Culture of primary human gingival fibroblasts on biodegradable membranes. **Biomaterials**, v.23, n.6, p.1461-9, Jan. 2002.

32 HUGHES, F.J.; SMALES, F.C. The distribution and quantitation of cementum-bound lipopolysacharide on periodontally diseased root surfaces of human teeth. **Archs Oral Biol**, v.35, n.4, p.295-9, 1990.

33 HUGHES, F.J.; SMALES, F.C. Attachment and orientation of human periodontal ligament fibroblasts to lipopolysaccharide-coated and pathologically altered cementum *in vitro*. **Eur J Prosthodont Rest Dent**, v.1, n.2, p.63-8, 1992.

34 ISIK, A.G. et al. A comparative scanning electron microscopic sutudy on the characteristics of desmineralized dentin root surface using different tetracycline HCl concentrations and apllication times. **J Periodontol**, v.71, n.2, p.219-25, Feb. 2000.

35 JONES, W.A.; O'LEARY, T.J. The effectiveness of *in vivo* root planing in removing bacterial endotoxin from the roots of periodontally involved teeth. **J Periodontol**, v.54, n.7, p.337-42, July 1978.

36 KARRING, T. et al. Development of the biological concept of guided tissue regeneration – animal and human studies. **Periodontology 2000**, v.1, p.26-35, Feb. 1993.

37 KAWAGUCHI, H. et al. Immunodetection of noncollagenous matrix proteins during periodontal tissue regeneration. **J Periodontal Res**, v.36, n.4, p.205-13, Aug. 2001.

38 KLAUSEN, B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. **J Periodontol**, v.62, n.1, p.59-73, Jan. 1991.

39 KURU, L. et al Flow cytometry analysis of guided tissue regeneration-associated human periodontal cells. **J Periodontol**, v.72, n.8, p.1016-24, Aug. 2001.

40 LASHO, D.J.; O'LEARY, T.J.; KAFRAWY, A.H. A scanning electron microscope study of the effects of various agents on instrumented periodontally involved root surfaces. **J Periodontol**, v.54, n.4, p.210-20, Apr. 1983.

41 LINDHE, J.; ERICSSON, I. Effect of ligature placement and dental plaque on periodontal tissue breakdown in the dog. **J Periodontol**, v.49, n.7, p.343-350, July 1978.

42 LINDHE, J.; Karring, T.; Lang, N. (Ed.). Patogênese da Periodontite. In: Denis F. Kinane e Jan Lindhe. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral.** 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.127-52.

43 LING, L. et al. Response of regenrative tissues to plaque: a histological study in monkeys. **J Periodontol**, v.65, n.8, p.781-7, Aug. 1994.

44 LISTGARTEN, M.A. Electron microscopic study of the junction between surgically denuded root surfaces and regeneration periodontal tissues. **J Periodontol Res**, v.7, n.1, p.68-90, 1972.

45 LISTGARTEN, M.A. Similarity of epithelial relationships in the gingiva of rat and man. **J Periodontol**, v.46, n.11, p.677-80, Nov. 1975.

46 LOWENGUTH, R.A.; BLIEDEN, T.M. Periodontal regeneration: root surface demineralization. **Periodontology 2000**, v.1, p.54-68, Feb. 1993.

47 MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. Esterologia. In:_____. **Métodos quantitativos em morfologia**. Rio de Janeiro: Ed. UERJ, 1995. p.72-115.

48 MARIOTTI, A. The extracellular matrix of the periodontium: dynamic and interactive tissues. **Periodontology 2000**, v.3, p.39-63, Oct. 1993.

49 MATTSON, J.S.; GALLAGHER, S.J.; JABRO, M.H. The use of 2 biosorbable barrier membranes in the treatment of interproximal intrabony periodontal defects. **J Periodontol**, v.70, n.5, p.510-7, May 1999.

50 MAYFIELD, L. et al. Root conditioning using EDTA gel as an adjunct to surgical therapy for the treatment for intraosseous periodontal defects. **J Clin Periodontol**, v.25, n.9, p.707-14, Sept. 1998.

51 MELCHER, A.H. On the repair potential of periodontal tissues. **J Periodontol**, v.47, n.5, p.256-60, May 1976.

52 NALBANDIAN, J.; COTE, N. Direct histological comparison of periodontal wound healing in the beagle dog with and without citric acid conditioning. **J Periodontal Res**, v.17, n.1, p.552-62, 1982.

53 NYMAN, S. et al. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. **J Clin Periodontol**, v.9, n.5, p.290-6, July 1982.

54 ÖKTE, E ; BAL, B. Topography of periodontally involved human root surfaces after different chemical treatment modalities: an *in vitro* scanning electron microscopic study. **J Oral Sci**, v.42, n.3, p.139-46, 2000.

55 ÖKTE, E. et al. Histological assessment of root cementum at periodontally healthy and diseased human teeth. **J Oral Sci**, v.41, n.4, p.177-80, 1999.

56 PETELIN, M. et al. The permeability of human cementum in vitro measured by electron paramagnetic resonance. **Arch Oral Biol**, v.44, n.3, p.259-67, Mar. 1999.

57 PILLATI, G.L. **Estudo “in vitro” da capacidade de remoção da “smear layer” da superfície radicular com o uso do gel de EDTA. Influência da concentração, tempo e forma de aplicação.** 2001, 140f. Dissertação (Mestrado em Odontologia, Área de Concentração em Periodontia)- Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

58 POLSON, A.M. The root surface and regeneration; present therapeutic limitations and future biologic potentials. **J Clin Periodontol**, v.13, p.995-9, 1986.

59 POLSON, A.M.; CATON, J. Factors influencing periodontal repair and regeneration. **J Periodontol**, v.53, n.10, p.617-25, Oct. 1982.

60 POLSON, A.M.; HANES, P.J. Cell and fiber attachment to desmineralized dentin. **J Clin Periodontol**, v.14, p.357-65, 1987.

61 POLSON A.M.; PROYE, M.P. Fibrin linkage: a precursor for new attachment. **J Periodontol**, v.54, n.3, p.141-7, Mar. 1983.

62 POLSON, A.M.; LANDENHEIM, S.; HANES, P.J. Cell and fiber attachment to desmineralized dentin from periodontitis-affected root surfaces. **J Periodontol**, v.57, n.4, p.235-46, Apr. 1986.

63 POLSON, A.M. et al. The production of a root surface smear layer by instrumentation and its removal by citric acid. **J Periodontol**, v.55, n.8, p.443-6, Aug. 1984.

64 REGISTER, A.A. Bone and cementum induction by dentin, desmineralized *in situ*. **J Periodontol**, v.44, n.1, p.49-57, Jan. 1973.

65 REGISTER, A.A.; BURDICK, F.A. Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized *in situ*. I. Optimum range. **J Periodontol**, v.46, n.11, p.646-55, Nov. 1975.

66 REGISTER, A.A.; BURDICK, F.A. Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized *in situ*. II. Defect Repair **J Periodontol**, v.47, n.9, p.497-505, Sept. 1976.

67 RICARDO, L.H. **Estudo comparativo da utilização local de tetraciclina, minociclina e ácido cítrico como coadjuvantes a instrumentação periodontal: análise histológica em ratos.** 2002, 160f. Tese (Doutorado em Odontologia, Área de Concentração em Biopatologia Bucal)- Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos.

68 SAMPAIO, J.E.C. **Eficiência de detergentes e EDTA na remoção da "smear layer" de superfícies radiculares submetidas a raspagem e aplainamento. Análise através da microscopia eletrônica de varredura.** 1999. 73f. Tese (Livre Docência em Odontologia , Área de concentração Periodontia)- Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

69 SCANTLEBURY, T.V. 1982-1992: a decade of technology development for guided tissue regeneration. **J Periodontol**, v.64, n.11, p.1129-37, Nov. 1993.

70 SCHOUR, I.; MASSLER, M. The teeth. In: GRIFFITH, J.Q.; FARRIS, E.J. **The rat in Laboratory Investigation.** Philadelphia:Lippincott, 1942. cap. 6, p.102-27.

71 SELVIG, K.A. Discussion: animal models in reconstructive therapy. **J Periodontol**, v.65, n.12, p.1169-72, Dec. 1994.

72 SMITH, B. et al. Effects of citric acid and fibronectin and laminin application in treating periodontitis. **J Clin Periodontol**, v.14, n.7, p.396-402, Aug. 1987.

73 SMITH, A.B. et al. Effects of citric acid and various concentration of fibronectin on healing following periodontal flap surgery in dogs. **J Periodontol**, v.58, n.10, p.667-73, Oct. 1987.

74 SMITH, S.R. et al. A double-bind placebo-controlled trial of azithromycin as an adjunct to non-surgical treatment of periodontitis in adults: clinical results. **J Clin Periodontol**, v.29, n.1, p.54-61, Jan 2002. Disponível em: http://www.probe.com.br. Acesso em: 12 de março de 2002.

75 SOCRANSKY, S.S. et al. New concepts of destructive periodontal disease. **J Clin Periodontol**, v.11, n.1, p.21-32, Jan. 1984.

76 STAHL, S.S. Repair potential of the soft tissue-root interface. **J Periodontol**, v.48, n.9, p.545-52, Sept. 1997.

77 TAGA, R.; STIPP, A.C.M. **Manual prático de morfometria ao microscópio óptico. Planejamento e desenvolvimento de um experimento.** Bauru: Departamento de Morfologia FOB/USP. Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, 1994. 35p.

78 TAKATA, T.; WANG, H-L.; MIYAUCHI, M. Attachment, proliferation and differentiation of periodontal ligament cells on various guided tissue regeneration membranes. **J Periodontol Res**, v.36, n.5, p.322-7, Oct. 2001.

79 TEN CATE, A. R. Desenvolvimento do periodonto. In:____. **Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função.** 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap.12, p.222-37.

80 WEINBERG, M.A.; BRAL, M. Laboratory animal models in periodontology. **J Clin Periodontol**, v.26, p.335-40, 1999.

81 WIKESJÖ, U.M.E.; SELVIG, K.A. Periodontal wound healing and regeneration. **Periodontology 2000**, v.19, n.7, p.21-39, 1999.

82 WIKESJÖ, U.M.E. et al. Early healing events at the dentin-connective tissue interface. Light and transmission electron microscopy observations. **J Periodontol**, v.62, n.1, p.62-5, Jan. 1991.

83 WIKESJÖ, U.M.E.; NILVÉUS, R.E.; SELVIG, K.A. Significance of early healing events on periodontal repair: a review. **J Periodontol**, v.63, n.3, p.158-65, Mar. 1992.

84 ZAMAN, K.U. et al. A study of attached and oriented human periodontal ligament cells to periodontally diseased cementum and dentin after demineralizing with neutral and low pH etching solution. **J Periodontol**, v.71, n.7, p.1094-9, July 2000.

Anexo A – Certificado do comitê de ética e pesquisa animal – São José dos Campos

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, que o protocolo n°021/2001-PA/CEP, sobre **"Influênica do gel de EDTA a 24% no tratamento da doença periodontal induzida em ratos. Análise Histológica"**, sob a responsabilidade de **Luana Marotta Reis**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Coitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 06 de novembro de 2001.

Prof. Adj. Paulo Villela Santos Junior
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

Apêndice A – Análise do preenchimento por **epitélio**

TABELA 21 – Valores médio de preenchimento (%) por **epitélio** para cada tratamento e tempo de sacrifício

EDTA	CONTROLE	PLACEBO	TS*
15,00	6,75	25,25	4
37,25	25,50	53,00	4
18,25	21,00	19,50	4
14,00	15,50	15,00	4
25,75	22,00	34,25	4
14,25	24,75	25,00	10
17,75	19,50	9,75	10
11,75	11,25	10,25	10
13,62	12,75	34,00	10
10,75	22,75	26,50	10
18,50	10,25	6,25	28
32,50	8,00	7,50	28
18,75	2,50	19,50	28
10,00	19,00	7,25	28
18,75	7,75	4,00	28

*: tempo de sacrifício

Apêndice B – Análise do preenchimento por **tecido conjuntivo inflamado**

TABELA 22 – Valores médio de preenchimento (%) por **tecido conjuntivo inflamado** para cada tratamento e tempo de sacrifício

EDTA	CONTROLE	PLACEBO	TS*
27,75	36,25	10,25	4
14,75	25,75	6,25	4
13,75	15,50	23,00	4
23,25	22,75	40,25	4
20,50	28,75	19,00	4
14,00	17,75	29,25	10
15,00	26,00	21,00	10
22,00	25,00	29,00	10
17,68	26,00	4,00	10
19,75	25,25	18,75	10

*: tempo de sacrifício

Apêndice C – Análise do preenchimento por **tecido conjuntivo sadio**

TABELA 23 – Valores médio de preenchimento (%) por **tecido conjuntivo sadio** para cada tratamento e tempo de sacrifício

EDTA	CONTROLE	PLACEBO	TS*
24,50	8,50	4,50	4
0	3,00	2,00	4
9,75	3,00	7,25	4
8,00	10,25	2,00	4
20,50	17,75	5,25	4
34,00	33,25	5,25	10
25,25	16,00	25,75	10
19,50	14,00	4,75	10
25,00	10,50	0	10
19,75	13,50	11,25	10
55,00	70,25	57,25	28
34,75	67,50	56,75	28
42,50	82,75	57,25	28
45,75	28,25	76,25	28
34,75	55,00	61,00	28

*: tempo de sacrifício

Apêndice D – Análise do **preenchimento total da área**

TABELA 24 – Valores médio **preenchimento total da área** (%) para cada tratamento e tempo de sacrifício

EDTA	CONTROLE	PLACEBO	TS*
67,25	51,60	40,00	4
52,00	54,25	61,25	4
41,75	39,75	49,75	4
45,25	48,50	57,25	4
54,50	68,50	58,50	4
62,25	75,75	59,50	10
57,75	61,50	56,50	10
53,25	50,25	44,00	10
56,25	49,25	35,00	10
51,75	61,50	56,50	10
72,25	80,50	63,50	28
67,25	75,50	64,25	28
61,25	85,25	76,75	28
55,75	47,25	83,50	28
53,50	62,75	64,50	28

*: tempo de sacrifício

REIS, L.M. **The influence of 24% EDTA gel in the treatment of periodontal disease induced in rats:** histological analysis. 2002. 121f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate if 24% EDTA gel (pH 7.0) presented adjunctive effect to non-surgical periodontal treatment in induced periodontitis in rats. Periodontitis was induced in the second upper left permanent molars of 45 male rats by means of ligature insertion of cotton floss. After 5 weeks, the ligature was removed and the animals underwent scaling and root planning. The animals were randomly divided in 3 groups: group E (EDTA), group C (control), and group P (placebo). Group E was conditioned with 24% EDTA gel (pH 7.0) for 2 minutes; the animals in group C received only mechanical treatment; and group P was conditioned with placebo gel (pH 7.0) for 2 minutes. All the groups were rinsed with 0.9% saline solution for 1 minute. Following that, root notching was carried out in the deepest part of the pocket. The animals were sacrificed at 4, 10, and 28 days after treatment. Jaw fragments containing the molars underwent histological and histomorphometric analysis for the evaluation of the degree of filling and the kind of tissue present in the notching region. The averages obtained were evaluated by means of ANOVA and Tukey statistical tests to a significance level of $p < 0.05$. With respect to the type of treatment employed, the results indicated that there were no statistically significant differences regarding periodontal repair. However, the longer the time between treatment and sacrifice, the better the tissue repair was, since the animals sacrificed at 28 days presented smaller quantities of epithelium, greater quantities of healthy connective tissue and total notch filling. Lack of inflamed connective tissue in this period was also observed. It was concluded that 24% EDTA gel (pH 7.0) did not contribute to periodontal tissue repair when used in combination with non-surgical periodontal treatment.

KEY WORDS: scaling and root planning; EDTA; root etching; histomorphometric analysis.

Autorizo a reprodução xerográfica deste trabalho

São José dos Campos, 17 de junho de 2002.

_____

Luana Marotta Reis

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:

BELLINI, A.B.; SILVA, E. A. **Manual para elaboração de monografias:** estrutura do trabalho científico. São José dos Campos: FOSJC/UNESP, 2000. 81p.

REIS, L.M. **Influência do gel de EDTA a 24% no tratamento da doença periodontal induzida em ratos:** análise histológica. 2002. 121f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos.

Quadro 1: Estudos *in vivo* com EDTA

Autores	Amostra	Estudo	Tratamento	Forma de aplicação	Resultados
Blomlöf et al.[21], 1996	24 dentes	MEV	1.Rasp (raspagem) 2.Rasp + tripsina a 1% - 20 min (minutos) 3.Rasp + gel EDTA a 24% - 2 min 4.Rasp + gel EDTA a 24% - 2 min + tripsina a 1% - 20 min	Subgengival com seringa	Abertura dos túbulos dentinários e exposição de fibras colágenas no grupo 4.
Blomlöf et al.[16], 1997	24 dentes	MEV	1.Rasp ultrasom ponta convencional + irrigação com água 2.Rasp ultrasom ponta convencional + irrigação com EDTA a 24% 3.Rasp ultrasom ponta modificada + irrigação com água 4.Rasp ultrasom ponta convencional + irrigação com EDTA a 24%	Irrigação	Remoção mais efetiva da SL (*smear layer*) e maior exposição de fibras colágenas no grupo 4. Presença de SL quando se utilizou a irrigação com água.
Mayfield et al.[50], 1998	36 pacientes (defeitos infra-ósseos)	Estudo Clínico	1.Cir (cirurgia) + tratamento mecânico 2.Cir + tratamento mecânico + gel de EDTA a 24% - 3 min	Passiva	Redução significativa na profundidade de sondagem, ganho de inserção, porém, não houve diferença entre os grupos com relação aos defeitos ósseos.
Blomlöf et al.[19], 2000	91 pacientes	Estudo Clínico	1.Rasp + sol (solução) fisiológica – 20 seg (segundos) 2.Rasp + gel EDTA 24% - 2 min + sol. Fisiológica – 20 seg	Subgengival com seringa	Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos.

Quadro 2: Estudos *in vitro* com EDTA

Autores	Amostra	Estudo	Tratamento	Forma de aplicação	Resultados
Blomlöf et al.[14], 1997	12 dentes	MEV	Rasp + gel EDTA nas concentrações : 1,5; 5; 15 e 24%		Remoção mais efetiva da SL e maior exposição das fibras colágenas com solução de EDTA a 24%
Blomlöf et al.[15], 1997	24 dentes	MEV	1.Rasp manual 2.Rasp ultrasom 3. Rasp com instrumentos rotatórios Todos os grupos foram associados com gel de EDTA a 24% - 2 min	Passiva	Houve formação da SL independente da forma de instrumentação. Remoção efetiva desta e exposição de fibras colágenas em diferentes graus com gel de EDTA a 24%.
Sampaio[68], 1999	105 fragmentos de raiz	MEV	1.rasp + sol. fisiológica 2.rasp + lauril sulfato de sódio 3.rasp + detergente de mamona 4.rasp + Plax 5.rasp + EDTA a 24% Apicação durante 1, 2 e 3 min. com irrigação a cada 1 min	Ativa troca a cada 30 seg.	Remoção da smear layer mais efetiva com EDTA a 24% quando comparado com os outros condicionadores, independente do tempo de aplicação.
Pillati[57], 2001	240 amostras	MEV	1.Rasp + sol. fisiológica a 0,9% 2.Rasp + gel EDTA variando de 5 a 24 % Tempo de aplicação: 1 a 3 min	Passiva Ativa	A superfície tratada com gel de EDTA aplicado ativamente durante 3 minutos demonstrou maior remoção da SL.

Quadro 3: Estudos comparativos *in vivo* utilizando o EDTA

Autores	Amostra	Estudo	Tratamento	Forma de aplicação	Resultados
Blomlöf, & Lindskog[12], 1995	16 dentes	Atividade enzima LDH	1.Cir + osteot (osteotomia) + rasp 2.Cir + osteot + rasp + ác. cítrico pH 1 3. Cir + osteot + rasp + ác fosfórico pH 1 4. Cir + osteot + rasp + EDTAa 24% pH 7 Tempo de aplicação: 20 seg e 3 min	Passiva com troca a cada 60 seg	Redução na atividade da enzima lactatodesidrogenase nos grupos tratados com ácido cítrico e ácido fosfórico, ao contrário dos grupos controle e tratado com EDTA a 24%
Blomlöf[11], 1996	32 dentes (16 dentes de macacos 16 dentes humanos)	MEV	1.Rasp 2.Rasp + EDTA 24% 3.Rasp + ácido cítrico 4.Rasp + ácido fosfórico Aplicação durante 3 min e irrigação com água deionizada por 5 min	Aplicação com cotonetes	O EDTA expôs seletivamente as fibras colágenas, tanto do cemento sadio e doente. As substâncias de pH baixo, promoveram erosão na superfície radicular.
Blomlöf et al. [18], 1996	32 dentes	Análise Histomor-fométrica	1.Cir + osteot + rasp + sol salina 2.Cir + osteot + rasp + ácido cítrico (AC) pH 1 – 3 min 3. Cir + osteot + rasp + EDTA a 24% pH 7 – 8 min	Troca algodão 30” (AC) e 4’ (EDTA)	Menor recessão gengival, presença de bolsa periodontal e extensão de epitélio juncional e maior extensão de cemento e nova inserção com EDTA a 24%, comparado ao grupo controle. Menor recessão gengival e de bolsa periodontal e maior nova inserção histológica com EDTA a 24% em relação ao ácido cítrico.
Blomlöf et al. [20], 2000	90 sítios	Estudo Clínico	1.Cir + rasp + sol. fisiológica – 20 seg 2.Cir + rasp + ácido cítrico pH 1 – 20 Seg + sol. fisiológica – 20 seg 3. Cir + rasp + gel EDTA 24%- 2 min + sol. fisiológica – 20 seg	Passiva	Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos quanto à redução na profundidade de sondagem e ganho no nível de inserção clínica.

Quadro 4: Estudos comparativos *in vitro* utilizando o EDTA (continua)

Autores	Amostra	Estudo	Tratamento	Forma de aplicação	Resultados
Lasho et al.[40], 1983	50 dentes	MEV	1.Rasp + ác cítrico pH 1 – 3 min 2.Rasp + EDTA 15% pH 7.7 – 5min 3.Rasp + hipocl (hipoclorito) de sódio – 5 min 4.Rasp + hipocl de sódio – 5 min + ác cítrico pH 1 – 3 min 5.Rasp + deoxicolato de Na – 1 min + água destilada – 1 min +m fração IV de Cohn 5% - 1 min		Remoção dos debris, abertura dos túbulos dentinários e exposição de fibras colágenas nos grupos 1, 2 e 4.
Fardal & Lowenberg[24], 1990	120 espécimes	Cultura	1.Rasp 2.Rasp + ácido cítrico pH 1 – 5 min 3.Rasp + EDTA 18% - 30 min		A migração celular foi mais acentuada nos grupos que receberam condicionamento ácido. Não houve diferença entre o ácido cítrico e o EDTA.
Blomlöf & Lindskog[13], 1995	56 dentes (7 macacos)	MEV	1.Rasp 2.Rasp + sol tampão fosfato 3.Rasp + ácido cítrico pH 1 4.Rasp + ácido fosfórico a 37% - pH 1 5.Rasp + EDTA a 24% - pH 7 Tempo de aplicação de 20 seg a 3 min	Passiva e Ativa	EDTA realizou desmineralização mais seletiva, expondo a matriz colágena. Nos grupos do ácido cítrico e fosfórico, ocorreu remoção também da matriz orgânica.
Bergenholtz & Babay[9], 1998	12 dentes (76 espécimes)	MEV	1.Rasp + sol salina 2.Rasp + HCL-TTC pH 1,8 3.Rasp + ácido cítrico pH 1 4.Rasp + EDTA 8% pH 7,3 Tempo de aplicação: 10, 30 e 180 seg	Passiva e ativa	A maneira e o tempo de aplicação do condicionador ácido pode interferir na regeneração periodontal. O ácido cítrico necessita de menor tempo de aplicação do que o EDTA e o ácido fosfórico.
Babay[5], 2000	30 dentes (20 pacientes com DP)	MEV	Tratamento com instrumentos rotatórios ou manuais 1.Sol salina – 3 min 2.Sol saturada de HCL-TTC pH 1,8 – 3 min 3.EDTA a 8% pH 7,3 – 3 min	Passiva	Nos grupos experimentais (EDTA e HCl-TTC) a superfície radicular mostrou túbulos dentinários abertos, remoção da *smear layer*.

Quadro 4: Estudos comparativos *in vitro* utilizando o EDTA (conclusão)

Autores	Amostra	Estudo	Tratamento	Forma de aplicação	Resultados
Zaman et al. [84], 2000	5 dentes (pacientes com DP)	Cultura	1.Rasp + ácido cítrico pH 1,2 – 3 min 2.Rasp + EDTA 24% pH 7,04 – 3 min 3.Rasp + HCl-TTC 100mg/ml pH 2 4.Rasp	Imersão em cultura por 1, 3, 7 dias	Não houve diferença em relação a aderência e orientação entre os grupos experimentais, independente do condicionamento que receberam. Contudo, estas características foram maiores nos grupos experimentais quando comparado com o grupo controle.
Babay[6], 2001	18 raízes	Cultura	1.Rasp 2.Raspador elétrico de EMS 3.Raspador elétrico de Amdent Condicionamento com 1.Sol salina 2.Ácido cítrico pH 1 – 3 min 3.HCl-TTC pH 1,8 – 3min 4.EDTA pH 7,3 – 3 min	Cultura durante 72 horas	Maior número de fibroblastos aderidos aos espécimes tratados com condicionadores ácido.