



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



FÁBIO RENATO MANZOLLI LEITE

EFEITO DO CONDICIONAMENTO
RADICULAR COM ÁCIDO CÍTRICO, CITRATO DE
SÓDIO, EDTA E TETRACICLINA NA ADESÃO DE
ELEMENTOS SANGÜÍNEOS. *Estudo por meio de
microscopia eletrônica de varredura.*

ARARAQUARA
2006



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



FÁBIO RENATO MANZOLLI LEITE

EFEITO DO CONDICIONAMENTO RADICULAR
COM ÁCIDO CÍTRICO, CITRATO DE SÓDIO, EDTA E
TETRACICLINA NA ADESÃO DE ELEMENTOS
SANGÜÍNEOS. *Estudo por meio de microscopia eletrônica de
varredura.*

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Periodontia da Faculdade de
Odontologia de Araraquara da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
como parte dos requisitos para obtenção do
Título de Mestre em Periodontia.

Orientador: *Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio*

Co-orientador: *Profa. Dra. Letícia Helena Theodoro*

ARARAQUARA
2006

DADOS CURRICULARES

Fábio Renato Manzolli Leite

Nascimento 06/01/1982 Araraquara - SP

Filiação Amauri Antiquera Leite
Elza Regina Manzolli Leite

2000/2003 *Graduação em Odontologia*
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

2004/2006 *Curso de Pós-Graduação em Odontologia*
Área de Periodontia, Nível Mestrado, Faculdade de
Odontologia de Araraquara - UNESP

“E assim, depois de muito esperar,
num dia como outro qualquer, decidi triunfar...

Decidi não esperar as oportunidades e sim, eu mesmo buscá-las.
Decidi ver cada problema como uma oportunidade de encontrar uma solução.
Decidi ver cada deserto como uma possibilidade de encontrar um oásis.
Decidi ver cada noite como um mistério a resolver.
Decidi ver cada dia como uma nova oportunidade de ser feliz.

Naquele dia descobri que meu único rival
não era mais que minhas próprias limitações
e que enfrentá-las era a única e melhor forma de superá-las.
Naquele dia, descobri que eu não era o melhor
e que talvez eu nunca tenha sido.
Deixei de me importar com quem ganha ou perde.
Agora, me importa simplesmente saber melhor o que fazer.

Aprendi que o difícil não é chegar lá em cima, e sim deixar de subir.
Aprendi que o melhor triunfo que posso ter
é ter o direito de chamar a alguém de "Amigo".
Descobri que o amor é mais que um simples estado de enamoramento,
"o amor é uma filosofia de vida".

Naquele dia, deixei de ser um reflexo dos meus escassos triunfos passados
e passei a ser a minha própria tênue luz deste presente.
Aprendi que de nada serve ser luz se não vai iluminar o caminho dos demais.

Naquele dia, decidi trocar tantas coisas...

Naquele dia, aprendi que os sonhos são somente para fazer-se realidade.
E desde aquele dia já não durmo para descansar...
Agora simplesmente durmo para sonhar.”

Walt Disney

Dedicatória

A Deus

Muitas vezes me deparei com obstáculos nesta jornada e questionei o sentido desta vida. Ao final de mais uma etapa, entendo suas razões e posso perceber que os problemas nos fazem crescer mais rápido. Nos momentos mais difíceis, quando olhei para trás e vi apenas um rastro de pegadas na areia, tinha certeza de que não era meu e sim do Senhor, que me carregou em seus braços para que completasse mais este desafio.

Aos meus pais,

Existem palavras para agradecer todas as oportunidades de crescimento que vocês me proporcionaram, todas as coisas de que tiveram que abrir mão para me educar e fazer com que eu chegasse a este lugar? Eu não as encontrei. Simplesmente agradeço a tudo isto, também ao amor incondicional, ao carinho que me dedicaram e aos conselhos, entendendo meus momentos de ausência, inquietude e rispidez.

Ao meu irmão

Talvez a distância tenha nos feito perceber a importância de um para o outro, compartilhando os momentos de correria, apreensão, alegria, enfim, sempre pude contar com seu apoio.

Aos meus familiares

Presentes física ou espiritualmente sempre soube de seu apoio e torcida, querendo ver-me galgar os degraus mais altos da vida. Algumas vezes questionando minha ausência, excesso de trabalho, e eis aqui o motivo de tudo. Muito obrigado.

Agradecimentos especiais

Ao amigo e orientador Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio

Ao longo de 15 anos de convivência, aprendi a te admirar e respeitar, não só no âmbito profissional, mas também pessoal. Por manter as portas de sua casa sempre abertas como a um filho e ter me acolhido há quatro anos dentro da disciplina de Periodontia, possibilitando desta forma, meu crescimento científico, que culminou no ingresso neste curso de mestrado, além de entender meu desejo de alçar outros vãos a partir de agora, minha eterna gratidão, amizade e admiração.

À Prof^a. Dr^a. Letícia Helena Theodoro

Apesar da distância, seu esforço durante a pós-graduação permitiu o desenvolvimento deste trabalho. Além disso, sua experiência na área permitiu o aprimoramento de vários passos tornando este trabalho mais elaborado e diminuindo meu fardo.

À Prof^a. Dr^a. Lizeti Toledo de Oliveira Ramalho

Por ter me recebido, como estagiário na disciplina de Histologia e Embriologia, logo no primeiro mês da minha graduação nesta faculdade, sem me conhecer. Pelo exemplo científico, ético e pessoal, apoiando até hoje minhas idéias por mais malucas que possam parecer.

Agradecimentos

Aos professores da Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara: **Adriana, Carlinhos, Egbert, Élcio, Joni, José Eduardo, Silvana e Ricardo**, pela dedicação, competência e humildade com que atuam neste programa de pós-graduação e por estarem sempre disponíveis nos momentos em que precisei.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP**, nas pessoas da Diretora Prof^a. Dr^a. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio e do seu Vice-Diretor Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla, pela constante luta em proporcionar aos seus alunos as condições de realizar um excelente curso.

Ao ex-coordenador do curso de Pós-Graduação em Periodontia, **Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli**, e ao atual coordenador, **Prof. Dr. Carlos Rossa Júnior**, pelo profissionalismo e competência.

Aos **professores do Curso de Pós-Graduação** da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, pela atenção dedicada.

A todos os funcionários do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, em especial a **Cláudia, Maria do Rosário, Regina Lúcia, Terezinha e Zezé**, pelos momentos agradáveis que me proporcionam dentro do departamento.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, **Alexandre, Mara, Sylvia e Rosângela**, por serem sempre pacientes e prestativos.

Aos meus colegas de turma: **Dani Spirandelli, Dani Zandim, Débora, Denise, Gabi, Maurício, Miltinho, Rafaela, Rafael Sartori e Rafael Faeda**, por estarem sempre presentes não só durante as “espinafradas”, dividindo a carga do curso, mas também nos momentos de descontração, essenciais para conclusão deste trabalho.

À nossa equipe de trabalho:

A **Dani Zandim** pela amizade, competência, atenção e garra colocadas no desenvolvimento de nossas pesquisas. Agradeço a paciência nos momentos de estresse, a simplicidade de perdoar os erros e o carinho dispensado.

A **Andréa Abi Rached** que mesmo tendo seus compromissos familiares, despendeu momentos valiosos para desenvolvimento deste trabalho. Obrigado pela amizade e por me ensinar a encarar os problemas de frente.

E ao **Rodrigo Cavassim** por ter se disposto a integrar esta equipe, agilizando a obtenção das amostras em Ponta Grossa, além de parar suas atividades para apressar a análise microscópica para que este trabalho pudesse ser finalizado a termo.

Aos meus pais, na qualidade de professores, **Amauri Antiquera Leite e Elza Regina Manzolli Leite**, pela ajuda na adequação metodológica, sugestão da aplicação do citrato de sódio e orientação na análise dos resultados.

A todos os **amigos do curso de Pós-Graduação e da disciplina de Periodontia**, em especial a Vanessa, Ana Emília, Fernando, Bia, Ivy, Ju Moraes, Yeon e Aline, pela presença nos momentos de dúvida, estresse e

tristeza, tentando me alegrar com suas palavras amigas ou mesmo tirando o sarro.

Aos profissionais do **Centro de Referência Diagnóstica** e do **Núcleo de Atendimento à Comunidade**, pela coleta do sangue e realização dos exames laboratoriais.

Ao Sr. **Sebastião Anésio Dametto**, técnico em microscopia eletrônica, do Instituto de Química do Campus de Araraquara – UNESP, pela ajuda na obtenção das fotomicrografias.

Aos **Amigos** que mesmo à distância, me deram forças, algumas broncas, conselhos e abriram as portas de outros centros para meu crescimento.

Aos pacientes que cederam seus dentes para realização desta pesquisa.

À **CAPES**, pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

Sumário

INTRODUÇÃO.....	11
REVISÃO DA LITERATURA.....	16
PROPOSIÇÃO.....	50
MATERIAL E MÉTODO.....	52
Seleção dos dentes.....	53
Preparo dos dentes.....	54
Visualização das fibras colágenas.....	57
Aplicação do sangue.....	58
Avaliação em microscopia eletrônica de varredura.....	61
Análise das fotomicrografias.....	61
Análise estatística.....	63
RESULTADO.....	64
Análise descritiva.....	65
Análise estatística.....	79
DISCUSSÃO.....	83
CONCLUSÃO.....	95
REFERÊNCIAS.....	97
ANEXOS.....	116
RESUMO.....	133
ABSTRACT.....	136

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Um dos objetivos do tratamento periodontal regenerativo é promover a inserção de tecido conjuntivo sobre a superfície radicular acometida pela doença periodontal. Tem sido demonstrado que os dentes de pacientes com periodontite são hipermineralizados e contaminados com substâncias citotóxicas, especialmente o lipopolissacarídeo – LPS (HATFIELD e BAUMHAMMERS, 1971; ALEO et al. 1974; LOPEZ, 1984), o qual representa o agente principal a ser vencido, para se obter uma nova inserção de tecido conjuntivo em raízes acometidas pela doença periodontal.

O cálculo dental e o biofilme bacteriano são considerados importantes fatores etiológicos locais da doença periodontal. A população bacteriana destas formas de agressão e seus produtos metabólicos invadem os tecidos periodontais de tal forma, que suas toxinas fixam-se à superfície do cemento e, como consequência, torna-se uma fonte constante de irritação tecidual, responsável pela destruição progressiva e, muitas vezes irreversível, das estruturas periodontais de sustentação.

O procedimento clínico que visa à remoção destes agentes etiológicos locais denomina-se “raspagem e aplainamento radicular” porém muitas vezes, esta não se mostra totalmente efetiva na remoção de depósitos mineralizados da superfície radicular. Além disso, este

tratamento gera *smear layer*, uma camada contendo remanescentes de cálculo dental, cimento contaminado, toxinas bacterianas e biofilme (JONES e O'LEARY, 1978; BLOMLÖF et al., 1996). Algumas pesquisas têm demonstrado que esta camada pode interferir na reparação periodontal (BAKER et al., 2000; ISIK et al., 2000; HANES et al., 1991). Assim sendo, estudos realizados tanto in vitro quanto in vivo têm enfatizado o condicionamento radicular como coadjuvante à raspagem, para remover *smear layer* e expor fibras colágenas da dentina ou do cimento, o que poderia auxiliar a reparação das estruturas periodontais perdidas (LAFFERTY et al., 1993; BLÖMLOF et al., 2000).

Vários agentes químicos têm sido propostos para esta finalidade, incluindo ácido cítrico, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), o cloridrato de tetraciclina, entre outros. Dentre estes, o ácido cítrico foi um dos primeiros a ser empregado. Apesar de alguns autores mostrarem maior inserção conjuntiva, cementogênese e neoformação óssea, outros acreditam que a necrose causada nos tecidos adjacentes devido ao seu baixo pH, o contra-indica (KASSAB e COHEN, 2003; BLOMLÖF e LINDSKOG, 1995a, 1995b; GARRETT et al., 1978; REGISTER e BURDICK, 1976).

As tetraciclinas, apesar de seu pH também baixo, foram empregadas inicialmente devido não só a sua capacidade de remover *smear layer*, mas também por ser um agente bactericida capaz de ser adsorvido na superfície dental e liberado lentamente por até 14 dias

(CHRISTERSSON et al., 1993; STABHOLZ et al., 1993a, 1993b). Outras vantagens de sua aplicação são: promoção da adesão e proliferação de fibroblastos e inibição da ação do hormônio da paratireóide, responsável em parte pela reabsorção óssea (LAFFERTY et al., 1993; STABHOLZ et al., 1993a, 1993b; GOLUB et al., 1994; JEONG et al., 1994; BABAY, 2001).

Uma alternativa proposta às substâncias de baixo pH foi o EDTA, o qual, de modo diferente aos agentes anteriores, não desmineraliza a superfície e sim, quela os íons cálcio, removendo a matriz inorgânica, preservando a rede de fibras colágenas (BAKER et al., 2005; GAMAL e MAILHOT, 2003; KASSAB e COHEN, 2003; BERGENHOLTZ e BABAY, 1998; BLOMLÖF et al., 1996; BLOMLÖF e LINDSKOG, 1995a, 1995b).

Outra substância com propriedade quelante semelhante ao EDTA é o citrato de sódio. Apesar de não serem encontrados estudos onde ele é empregado na biomodificação radicular, que é o processo no qual agentes químicos são empregados na remoção de *smear layer* e exposição fibras colágenas, trabalhos testando sua toxicidade e cinética molecular justificam a tentativa deste trabalho em utilizá-lo para este fim. Ele é o anticoagulante de escolha para bolsas de sangue, pois apresenta menor grau de toxicidade celular do que o EDTA (DEWAN et al., 1982). Outro fator importante é que o citrato de sódio apresenta constante de ligação ao íon cálcio mais baixa do que o EDTA, sugerindo uma reação

mais controlada, podendo tornar sua remoção da superfície dental mais fácil (NISHIOKA et al., 2002). Segundo Lan et al. (1999), o citrato de sódio apresenta características citotóxicas para fibroblastos gengivais menos acentuadas do que o ácido cítrico.

A formação e adesão do coágulo sangüíneo constituem a fase inicial do processo de cicatrização dos tecidos periodontais (HIATT et al., 1968; POLSON e PROYE, 1983; WIKESJÖ et al., 1992). A rápida aderência do coágulo sangüíneo sobre a raiz promove a formação de uma barreira capaz de diminuir a migração apical do tecido epitelial (WIKESJÖ et al., 1991; CATON e GREENSTEIN, 1993). Dessa forma, a exposição de fibras colágenas dentais, pela aplicação de agentes químicos, pode promover a ativação e agregação plaquetária, culminando na formação de uma rede de fibrina insolúvel, a qual pode atuar como arcabouço para adesão e proliferação de células do tecido conjuntivo (STEINBERG e WILLEY, 1988; JENNY e MANN, 1989; BAKER et al., 2005).

Assim, parece oportuno avaliar a adesão e estabilização da rede de fibrina sobre a superfície radicular, após a aplicação de agentes químicos para remoção de *smear layer*, na tentativa de justificar os diferentes resultados encontrados na literatura.

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

Devido à maioria dos trabalhos na literatura utilizarem mais de uma substância no condicionamento radicular, dificultando realizar uma revisão do conteúdo literário separadamente para cada um dos agentes químicos, os estudos abaixo foram organizados por ordem cronológica.

Há alguns anos sabe-se que a utilização de instrumentos manuais, rotatórios, sônicos e ultra-sônicos promove a formação e deposição de *smear layer*, também conhecida como camada de esfregaço. Alguns estudos sugerem que esta camada pode atuar como barreira física entre os tecidos periodontais e a superfície radicular, o que levaria a inibição de inserção do tecido conjuntivo sobre a raiz dental e formação de um epitélio juncional longo (BAKER et al., 2005; ABIRACHED, 2003; BAKER et al., 2000; ISIK et al., 2000; PILATTI, 2001; SAMPAIO, 1999; HANES et al., 1991).

Dessa forma, vários estudos têm sido realizados na tentativa de encontrar o melhor agente para remoção de *smear layer*, permitindo a visualização dos túbulos dentinários, exposição das fibras colágenas tanto da superfície da dentina quanto do cimento e que promova a descontaminação da superfície radicular recoberta por endotoxinas

bacterianas, sem causar danos extensos aos tecidos periodontais adjacentes.

Um dos primeiros trabalhos foi realizado por Register e Burdick em 1975, onde os autores avaliaram histologicamente, em 1000 dentes de cães e gatos, se a aplicação de diferentes ácidos (com diferentes pH) e tempos de aplicação poderiam influenciar a cementogênese e a reinserção de fibras colágenas sobre a superfície dental. Com essa finalidade, defeitos ósseos foram cirurgicamente criados simulando um estágio avançado da doença periodontal com destruição óssea circunferencial. Os autores concluíram que a aplicação de ácidos da maneira correta, ou seja, de forma a limpar a superfície e expor fibras colágenas, estimula a nova formação cementária e inserção de fibras colágenas sobre a superfície dental. Além disso, nos dentes onde foi aplicado o ácido cítrico (pH 1,0) durante 2 ou 3 minutos, houve maior deposição de matriz de cemento e revascularização mais rápida do retalho.

No ano seguinte (1976), os mesmos autores avaliaram a eficiência da aplicação de uma solução saturada de ácido cítrico (pH 1,0) durante 2 minutos, na formação de nova inserção conjuntiva em cães. Defeitos ósseos foram criados ao redor dos dentes e após um período de cronificação, onde foi detectada inflamação gengival, retalhos mucoperiosteais foram realizados para raspagem e aplicação do ácido. Dessa forma, pela análise histoquímica e morfológica dos períodos iniciais

e finais (12 meses) após cirurgia, os autores concluíram que houve imbricamento mecânico do cimento neoformado sobre a superfície radicular desmineralizada, com penetração do tecido cementário na embocadura dos túbulos dentinários. Além disso, verificaram que após três meses de cirurgia, houve reinserção do tecido gengival sobre a superfície dental afetada pela doença periodontal crônica e limpa pelo ácido. Outros resultados obtidos foram: reparo de defeitos ósseos interproximais de uma parede por reinseção conjuntiva, grande porcentagem de falha no reparo de defeitos de furca e ósseos horizontais, e completo reparo ósseo alveolar após 12 meses, com presença de fibras ligamentares entre o tecido ósseo e o cimento neoformado. Os autores afirmaram que o condicionamento radicular com ácido cítrico é uma modalidade de tratamento válida no reparo de defeitos ósseos na terapia regenerativa periodontal.

Em 1978, Garrett et al. examinaram, em dentes extraídos por motivo de doença periodontal avançada, os efeitos da aplicação de solução saturada de ácido cítrico (pH 1,0) sobre a superfície radicular. Após análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), os autores concluíram que o uso deste ácido aumenta a quantidade de irregularidades na superfície dental e o número de fibras colágenas expostas, além disso, afirmam que sua aplicação só tem efeito sobre superfícies previamente raspadas para remoção do cimento, pois este se apresenta hipermineralizado pelo comprometimento periodontal.

Ririe et al. em 1980, realizaram retalhos em dentes de cães e raspagem e o condicionamento radicular com ácido cítrico (pH 1,0 por 3 minutos). As amostras foram avaliadas sob microscopia óptica de luz e por microscopia eletrônica de varredura. Os autores concluíram que houve maior reparo tecidual nos animais onde foi realizado a desmineralização radicular e que o mecanismo de ação provável foi a interdigitação entre as fibras colágenas da dentina e as fibrilas do tecido conjuntivo. Quanto à formação de cemento, os autores citam não terem verificado grande diferença entre os grupos, porém sugeriram a realização de um estudo mais longo.

Com a finalidade de avaliar clinicamente os efeitos da aplicação do ácido cítrico sobre a superfície radicular em humanos, Cole et al. (1981) verificaram que, 6 meses após a cirurgia a retalho pela técnica de Widman modificada em paciente com bolsas periodontais profundas, 60% dos pacientes apresentaram ganho no nível de inserção de pelo menos 2 mm, enquanto no grupo onde não foi feita a biomodificação, apenas 43% dos pacientes atingiram essa meta.

Ainda em 1981, Renvert e Egelberg realizaram a raspagem, por meio de realização de retalho, em dentes com bolsa periodontal $\geq$ 6mm de profundidade, sendo que um grupo foi apenas raspado e outro além deste procedimento, recebeu a aplicação de ácido cítrico (pH 1,0) por 3 minutos. Após 6 meses das cirurgias, o grupo onde foi realizada a biomodificação apresentou ganho médio no nível de inserção clínica de 2

mm, enquanto no grupo controle a média foi de 1,15 mm. Dessa forma, os autores citam ser a favor da aplicação do ácido cítrico, uma vez que além de melhores resultados clínicos, não observaram necrose significativa do retalho e nem hipersensibilidade dentinária em seus pacientes. Eles ressaltam que a técnica deve ser realizada cuidadosamente em áreas com possibilidade de inspeção visual.

Com a finalidade de avaliar o efeito antimicrobiano da solução saturada por ácido cítrico (pH 1,0), Daly (1982) cultivou bactérias presentes em bolsas periodontais antes e após tratamento, que consistiu da raspagem e irrigação com soro fisiológico (Grupo 1) e raspagem seguida pela aplicação da já citada solução ácida por 3 minutos (Grupo 2). O autor concluiu que a aplicação de ácido cítrico diminuiu significativamente o número de bactérias viáveis aeróbias e anaeróbias. No Grupo 1, onde foi realizada a irrigação com soro fisiológico, não foram encontradas diferenças antes e após raspagem. Segundo o estudo, este efeito é devido ao baixo pH do ácido cítrico e que ele deve ser considerado na remoção de resíduos de tecido mineralizado aderido na superfície dental (*smear layer*).

Lasho et al. (1983) avaliaram em MEV, 50 dentes humanos extraídos devido à doença periodontal avançada, se a raspagem e o alisamento radicular eram suficientes na descontaminação da raiz e na remoção de *smear layer* ou se havia necessidade de emprego de algum agente químico. Vinte e cinco dentes foram levemente raspados apenas

para remoção de cálculo, e os demais foram raspados vigorosamente até obter aparente remoção de todo cimento, obtendo uma superfície lisa e polida. Logo após, irrigação com solução salina foi realizada em 5 amostras, que foram armazenadas como controle. Os agentes químicos comparados foram: 1) Aplicação de solução saturada de ácido cítrico por 3 minutos; 2) Solução de EDTA a 15% por 5 minutos; 3) Hipoclorito de sódio por 5 minutos; 4) Hipoclorito de sódio por 5 minutos associado ao ácido cítrico por 30 segundos e 5) Deoxicolato de sódio a 2% por 1 minuto seguido pelo uso de fração IV1 de Chon's durante 1 minuto. As superfícies que tiveram apenas o cálculo dental removido apresentaram poucas fibras colágenas expostas após condicionamento químico. Os autores constataram que as substâncias dos grupos controle, 3 e 5, mesmo após raspagem, não foram suficientes para remoção de *smear layer* radicular. Além disso, relataram a necessidade do uso de agentes condicionadores como ácido cítrico, EDTA ou combinação de hipoclorito com ácido cítrico, em associação à raspagem, para exposição das fibras colágenas da superfície dentinária. Os autores ainda ressaltam que o EDTA promoveu alterações na morfologia das fibras colágenas.

O grau de irritação pulpar pela utilização de ácido cítrico foi avaliado por Yeung e Clarke em 1983. Para isso, os pesquisadores realizaram retalhos na vestibular de pré-molares de cães da raça *Beagle* e confeccionaram um defeito ósseo, simulando deiscência óssea vestibular, de cerca de 7 mm. Em seguida, realizaram a raspagem destes dentes e

dividiram os animais em 2 grupos: controle, onde foi aplicada solução salina; experimental I, aplicação de solução de ácido cítrico a 20% topicamente por 3 minutos e experimental II, ácido cítrico a 50% usado do mesmo modo anterior. Após 1, 7, 14, 28 e 56 dias da cirurgia, os dentes foram analisados histologicamente sob microscopia óptica de luz. Nenhuma alteração pulpar (inflamação, degeneração e calcificação) foi encontrada nos grupos controle e ácido cítrico a 20% em qualquer período. Já após 1 dia da utilização do ácido a 50%, pequena alteração pulpar reversível foi encontrada. Os autores concluíram que este ácido é incapaz de promover alterações pulpares nocivas, quando utilizado criteriosamente para remover *smear layer*.

Cogen et al. (1984) avaliaram o crescimento de fibroblastos sobre superfícies radiculares de dentes extraídos por severo acometimento periodontal. Os elementos dentais foram divididos em quatro grupos: sem tratamento (controle); raspagem e aplainamento radicular; aplicação de solução de ácido cítrico saturada (pH 1,0) por 3 minutos e raspagem seguida pela aplicação do ácido. Apenas as superfícies raspadas, condicionadas ou não, mostraram condições de crescimento para as células, sendo que a aplicação de ácido cítrico sobre a superfície raspada, aumentou ligeiramente a quantidade de células aderidas. Desta forma, os autores concluíram que a aplicação da solução de ácido cítrico sobre a superfície radicular raspada, auxilia na adesão e proliferação dos fibroblastos provenientes do ligamento periodontal.

Dreyer et al., também em 1984, avaliaram em babuínos (*Papio ursinus*), o grau de mineralização da superfície radicular afetada ou não pela doença periodontal e o efeito do condicionamento radicular por ácido cítrico sobre elas. Os autores concluíram que a superfície radicular contaminada é hipermineralizada e que a aplicação do ácido deve ser realizada após a raspagem para maior limpeza e exposição de fibras colágenas.

Em 1985, Hanes et al. analisaram o efeito do condicionamento radicular com ácido cítrico sobre superfícies radiculares, na inserção do tecido conjuntivo e epitelial em ratos. Metade das amostras foi apenas raspada e irrigada com soro fisiológico enquanto que a outra metade foi raspada e condicionada pela solução de ácido cítrico (pH 1,0 por 3 minutos). As amostras foram implantadas verticalmente no dorso dos animais, sendo que cada amostra permaneceu com uma porção fora do dorso (exposta ao meio ambiente) e outra submersa no tecido conjuntivo. Após 1, 3, 5 e 10 dias da implantação, os animais foram sacrificados e as peças analisadas morfológica e histometricamente sob microscopia óptica de luz. Os autores verificaram que no grupo condicionado por ácido, maior número de células e fibras estavam aderidas à superfície em relação ao grupo controle, além de nenhuma migração apical do tecido epitelial ser observada.

Com finalidade de testar os diferentes efeitos da solução de tetraciclina na regeneração periodontal, Claffey et al. em 1987 utilizaram

pré-molares de cães da raça *Beagle*, expondo 6 mm da porção radicular abaixo da junção cimento-esmalte, por meio da remoção cirúrgica do osso alveolar. As raízes permaneceram expostas ao ambiente bucal por três meses, sem controle de placa, para contaminação radicular. Após este período, as raízes foram cirurgicamente expostas e condicionadas com cloridrato de tetraciclina (TTC HCl) a 1% (pH 2,6) e o retalho reposicionado coronalmente. Após seis meses, os animais foram sacrificados e o elemento dental, juntamente com os tecidos periodontais adjacentes, foram removidos em bloco para análise histológica. Segundo os autores, nova inserção de tecido conjuntivo, que se estendia desde a junção cimento-esmalte até a base do defeito, foi obtida na maioria das amostras não havendo, portanto, migração epitelial e formação de epitélio juncional longo. Além dos autores ressaltarem a excelência da reparação tecidual, eles afirmaram que a aplicação da tetraciclina, por sua atividade antimicrobiana, deve ser considerada em procedimentos periodontais regenerativos.

Em um trabalho utilizando a mesma metodologia de implantação radicular vertical em dorso de ratos, Frantz e Polson (1988) aplicaram duas concentrações de tetraciclina (100 e 200 mg/cc) por 5 minutos na superfície da raiz. Os autores constataram que a aplicação das soluções de tetraciclina aumentou o número de células e fibras aderidas sobre a superfície dental, não havendo diferenças entre as duas concentrações. Além disso, eles ressaltam que mesmo após 10 dias de

avaliação, o tecido aderido sobre a superfície radicular não apresentava características morfológicas de um tecido conjuntivo inserido.

Em 1988, Adriaens et al. após avaliarem a penetração de bactérias odontopatogênicas nos túbulos dentinários, sugeriram o uso de agentes condicionadores e antimicrobianos na descontaminação radicular, uma vez que eles observaram que o tratamento periodontal convencional por meio da raspagem, não elimina as bactérias presentes no interior dos túbulos. De acordo com o estudo, tanto os túbulos dentinários, quanto riscos e depressões na superfície geradas pela instrumentação, poderiam agir como reservatórios para as bactérias periodontopatogênicas.

Bal et al. (1990), avaliaram a formação do coágulo em raízes de seis dentes humanos afetados pela doença periodontal. Cada dente foi dividido em três áreas: ligamento periodontal intacto (terço apical), raspagem (terço médio) e raspagem associada ao condicionamento (terço cervical). O condicionamento foi realizado em três dentes com solução de ácido cítrico 1% por 3 minutos e, nos demais três dentes, com solução de TTC HCl 50 mg/ml por 3 minutos. Os dentes foram extraídos, condicionados e reimplantados em seus alvéolos originais. Após 5 segundos, 1 minuto e 3 minutos, os elementos dentais foram removidos definitivamente do alvéolo. A análise por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou que após 3 minutos, as raízes tratadas pela

tetraciclina apresentavam coágulo em estágio de formação mais avançado em relação ao grupo tratado com ácido cítrico.

Um estudo in vitro com dentes bovinos, avaliou a superfície dentinária radicular após raspagem e alisamento radicular, associada ou não ao condicionamento com ácido cítrico (pH 1,0) ou cloridrato de tetraciclina a 0,5% durante 5 minutos. Os autores concluíram que a solução de tetraciclina promoveu desmineralização da dentina peritubular em menor grau do que o ácido cítrico e que maiores concentrações desta solução são necessárias para uma consistente remoção da *smear layer* resultante da instrumentação (HANES et al., 1991).

Neste mesmo ano, Handelsman et al. trataram defeitos ósseos, a maioria de 3 paredes (89%), de 18 pacientes por meio da técnica de regeneração tecidual guiada. Os autores dividiram os pacientes em 2 grupos, onde no primeiro realizaram apenas a raspagem e no outro, associaram a ela o uso de solução saturada de ácido cítrico. Em todos os pacientes foi verificado ganho médio de 3,5 mm no nível de inserção clínica. Os autores concluíram que a utilização da membrana de politetrafluoretileno (PTFE) no tratamento de defeitos com três paredes, resultou clinicamente numa significativa melhora nos níveis de inserção e ganho ósseo; o tamanho e a morfologia do defeito exerceram influência na quantidade de regeneração clínica obtida; em termos de profundidade, 60% do defeito foram preenchidos por tecido ósseo e o uso de ácido cítrico como coadjuvante na descontaminação da raiz não parece

melhorar os ganhos nos níveis de inserção e na quantidade de osso formado.

Labahn et al. (1992) avaliaram o efeito do ácido cítrico e tetraciclina HCl pela forma passiva ou ativa (esfregaço), na superfície dentinária radicular de terceiros molares inclusos recém-extraídos, durante 30, 60, 120 e 240 segundos. Foi concluído que o ácido cítrico atua mais profundamente do que o cloridrato de tetraciclina (HCl), levando a maior dissolução da superfície dentinária, abertura de túbulos e formação de irregularidades tais como depressões. Além disso, o modo de aplicação dos agentes não exerceu influência na morfologia da superfície radicular, uma vez que as alterações foram visíveis em todos os modos de aplicação.

Em um estudo avaliando regeneração tecidual, Kersten et al. (1992) avaliaram a qualidade da cicatrização de lesões periodontais infra-ósseas tratadas (12 defeitos) ou não com ácido cítrico (14 defeitos), após raspagem e inclusão de uma membrana de PTFE. Os pacientes foram instruídos quanto à higiene bucal logo após a cirurgia e após 12 meses do tratamento, os sítios cirúrgicos foram avaliados. Resultados semelhantes foram obtidos em ambos os grupos e os autores concluíram que o condicionamento radicular não é necessário, com a finalidade de melhorar os parâmetros clínicos periodontais.

Em relação ao tratamento de furcas, Parashis e Mitsis (1993) realizaram o condicionamento radicular com cloridrato de

tetraciclina (100 mg/mL) em lesões de furca grau II de pacientes periodontalmente comprometidos. Os indivíduos apresentavam lesões pareadas com perda de inserção clínica ≥ 5 mm. Um total de nove pares de defeitos foi incluído no estudo, sendo que cada par foi distribuído aleatoriamente para cada tratamento, e o mesmo indivíduo apresentou ambos os tratamentos após raspagem: condicionamento com tetraciclina recoberto com membrana PTFE-expandida, ou somente a membrana. Aproximadamente 4 a 6 semanas após a cirurgia, as membranas foram removidas. Seis meses após a cirurgia inicial, todos os parâmetros clínicos, particularmente no nível de inserção clínica horizontal, mostraram melhora clínica. Porém, estatisticamente não houve diferença significativa entre os sítios tratados apenas com membrana (regeneração tecidual guiada) e os sítios onde foi aplicado o cloridrato de tetraciclina.

Dyer et al. (1993) estudaram oito cães da raça *Beagle* com doença periodontal natural. Após quatro semanas da raspagem e do alisamento radicular, 4 sítios foram apenas raspados novamente e recobertos com membrana de PTFE-e, outros 4 foram biomodificados com ácido cítrico e recobertos por membrana e mais 4 defeitos foram tratados com tetraciclina HCl e também recobertos com membrana. Após 6 semanas as membranas foram removidas e a profilaxia foi realizada 3 vezes por semana com clorexidina, até o final do estudo. Após 4 meses após a cirurgia, as análises levaram os autores a concluir que a

aplicação de ácido cítrico ou de tetraciclina não promove melhora dos resultados atingidos com a regeneração tecidual guiada.

Da mesma forma, ainda em 1993, Fuentes et al. trataram 27 defeitos de furcas grau II vestibulares, na região mandibular de 16 pacientes, pela cirurgia a retalho com reposicionamento coronal, com e sem condicionamento da superfície radicular por ácido cítrico. Após avaliação dos parâmetros clínicos periodontais, os autores verificaram resultados ligeiramente melhores para o grupo onde foi aplicado o ácido cítrico, porém, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes. Segundo o estudo, o condicionamento com ácido cítrico pode não ser uma parte necessária da técnica regenerativa guiada, no caso tratamento de furcas mandibulares grau II.

Porém, após cinco anos de avaliação clínica, McClain e Schallhorn (1993) avaliaram os resultados da regeneração tecidual guiada (RTG) de pacientes tratados apenas com a técnica de RTG ou em combinação com o condicionamento radicular por ácido cítrico e enxerto ósseo autógeno. Desta forma, os pacientes que receberam tratamento com ácido cítrico e enxerto apresentaram melhor manutenção do quadro clínico periodontal do que aqueles onde apenas a RTG foi empregada.

Sterrett et al. (1993), tentaram identificar em dentes bovinos, a concentração e o tempo de aplicação ideal para o ácido cítrico. Quinze molares tiveram a camada de cimento removida com broca esférica nas superfícies lingual e vestibular. Uma depressão no centro de cada face foi

realizada para que a substância empregada não escorresse. As concentrações empregadas foram: 0% (controle), 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% e 65%, as quais foram utilizadas durante 1, 2 e 3 minutos. Ao final de cada período, o ácido remanescente na cavidade foi recolhido, por meio de hastes flexíveis de algodão, armazenadas em 10ml de água Omega 18 molar para análise em espectrofotometria atômica de absorção. Os resultados evidenciaram que os picos de maior desmineralização, de acordo com os tempos de 1, 2 e 3 minutos, ocorreram nas concentrações de 30%, 25% e 25%, respectivamente. Dessa forma, a desmineralização foi tempo-dependente.

Análises aos 14 e 21 dias após a biomodificação radicular, a respeito do efeito da aplicação do ácido cítrico e da tetraciclina HCl no desenvolvimento da microvascularização dos tecidos periodontais, com ou sem regeneração tecidual guiada em cães, mostraram que não houve nenhuma vantagem na administração de ácido cítrico e tetraciclina HCl na resposta vascular inicial (WANG et al.,1993).

Em 1994, Sammons et al. avaliaram em 4 cães de raça indefinida, o efeito do condicionamento radicular na cicatrização periodontal, com ou sem uso de regeneração tecidual guiada, por meio de exame auto-radiográfico. A colonização celular na área foi avaliada por meio de injeção de timidina tritiada por via endovenosa, uma hora após o procedimento cirúrgico. Os resultados sugeriram que o ácido cítrico e a tetraciclina HCl podem inibir a proliferação celular nos primeiros 3 dias da

reparação tecidual. Após 7 dias, as diferenças entre os agentes condicionantes foram mínimas, não mostrando vantagens sobre a aplicação de água estéril.

Jeong et al. (1994) avaliaram a aplicação subgengival de dois tipos de gel: o primeiro contendo tetraciclina apenas e um segundo com combinação de tetraciclina e ácido cítrico. Sessenta e quatro dentes uniradiculares com profundidade de sondagem entre 4 e 6 mm foram escolhidos para o teste. Os dentes foram divididos em 4 grupos: 1) raspagem e alisamento radicular apenas; 2) aplicação do gel de tetraciclina; 3) raspagem + gel de tetraciclina; 4) raspagem + gel de tetraciclina com ácido cítrico. Os pacientes foram avaliados quanto aos parâmetros clínicos periodontais (nível de placa, sangramento a sondagem, profundidade de sondagem e nível de inserção) no dia da cirurgia (baseline) e após 2, 4, 8 e 12 semanas do procedimento. Além disso, nesses mesmos períodos amostras de placa subgengival foram coletadas e analisadas sob microscopia de contraste de fase para bastonetes móveis e espiroquetas. Os autores concluíram que todos os tratamentos levaram a uma diminuição da profundidade de sondagem. O uso combinado da tetraciclina e do ácido cítrico promoveu maior ganho de inserção estatisticamente em relação à aplicação isolada do gel de tetraciclina (Grupo 2) e que esta combinação foi a mais efetiva na alteração da microbiota gengival, reduzindo o número de bacilos no sulco gengival.

Ainda em 1994, Trombelli et al. avaliaram as características do cimento e da dentina de raízes de terceiros molares impactados condicionadas com TTC HCl. Cinco amostras de cimento e outras cinco de dentina foram distribuídas aleatoriamente para aplicação das seguintes substâncias: a) Soro fisiológico por 1 minuto; b) TTC HCl 62,5 mg/ml por 1 minuto; c) TTC HCl 62,5 mg/ml por 4 minutos; d) TTC HCl 125 mg/ml por 1 minuto; e) TTC HCl 125 mg/ml por 4 minutos. Todas as substâncias foram aplicadas por meio de fricção com bolas de algodão, umedecidas a cada 30 segundos. Os autores verificaram que nas superfícies radiculares recobertas por cimento, o grupo controle ainda apresentava *smear layer* e fibras de Sharpey; já após aplicação de tetraciclina nenhum detrito foi encontrado, apenas fibras colágenas. Além disso, o tempo de aplicação e a concentração utilizada não influenciaram os resultados. Por outro lado, nas superfícies dentinárias, o grupo controle ainda se apresentava recoberta por *smear layer* ocluindo os túbulos dentinários; já, nos grupos "b" e "d", havia apenas indícios de *smear layer* na abertura dos túbulos; nos grupos "c" e "e", foi detectada ausência de *smear layer* e presença de fibras da matriz de colágeno. A concentração também não influenciou nos resultados, apenas o tempo de aplicação.

Trombelli et al. (1995) avaliaram em microscopia eletrônica de varredura, o efeito de diferentes concentrações e tempos de aplicação do cloridrato de tetraciclina, sobre superfícies radiculares de dentes extraídos por extensa destruição periodontal. Todas as substâncias foram

aplicadas por meio de bolas de algodão friccionadas sobre o espécime. Dessa forma, a aplicação da solução salina no grupo controle foi realizada durante 1 minuto. O cloridrato de tetraciclina foi aplicado nas concentrações de 10 e 100 mg/mL durante 1 e 4 minutos. Os resultados indicaram que em ambas as concentrações, a tetraciclina foi capaz de remover *smear layer* e expor a matriz colágena, sendo que a efetividade de seu uso estaria mais associada com seu tempo de aplicação do que com a concentração, uma vez que a aplicação por 4 minutos apresentou melhores resultados que a de 1 minuto.

Seguindo sua linha de estudos de 1993, Sterrett et al. (1995) avaliaram o efeito da pressão de aplicação do ácido cítrico nas superfícies dentinárias. Desta vez, 10 dentes humanos extraídos tiveram sua camada de cemento cervical removida por meio de fresas e a dentina foi alisada com instrumentos manuais, enquanto outros 10 dentes foram apenas raspados com preservação do cemento. Uma solução de ácido cítrico a 30% (pH 1,62) foi aplicada de 3 maneiras: tópica (passivamente), levemente esfregada contra a superfície e fortemente esfregada. Em todos os grupos bolas de algodão foram empregadas para administrar a substância durante 3 minutos, sendo a solução renovada a cada 30 segundos. Tanto na superfície dentinária, quanto na cementária maiores depressões e picos foram observados em MEV quando se empregou fricção (leve ou forte), quando comparada à aplicação tópica.

Para avaliar a possibilidade de necrose dos tecidos periodontais, adjacentes a superfícies radiculares biomodificadas, por agentes de baixo pH ou pH neutro, Blomlöf e Lindskog (1995a) utilizaram macacos de 4 anos de idade, nas raízes dos quais foram aplicados ácido cítrico, ácido fosfórico (ambos com baixo pH) e EDTA (pH neutro), durante uma cirurgia a retalho experimental. Os resultados clínicos de observação indicaram que o efeito necrótico dos agentes de pH baixo foi evidente após 20 segundos. Além disso, após 3 minutos, a penetração dos agentes promovia necrose dos tecidos em até $\frac{1}{4}$ da circunferência da raiz. Não foi observada ação de necrose com relação ao emprego do EDTA. Após análise sob microscopia óptica, concluíram que o EDTA possui a habilidade de expor seletivamente as fibras colágenas sem causar necrose. Os autores sugerem que experimentos in vivo sejam realizados para avaliar por um período longo os resultados obtidos.

Com o objetivo de avaliar a textura da superfície radicular e sua colonização por células, Blomlöf e Lindskog (1995b) condicionaram a raiz de dentes acometidos pela doença periodontal e indicados para extração. Os elementos dentais foram tratados por acesso cirúrgico com ácido cítrico, EDTA e ácido fosfórico. Segundo os autores, o EDTA comparado com o ácido cítrico e o ácido fosfórico, tem melhor ação na colonização celular e formação de tecido conjuntivo devido a sua ação mais seletiva na remoção dos minerais da superfície, promovendo maior exposição de fibras colágenas na superfície da dentina. A abundância do

colágeno é um requisito para a cinética da adesão celular. Ainda, concluíram que o EDTA, atuando por 3 minutos, não causa necrose nos tecidos adjacentes, pois atua em pH neutro.

Em 1996, Blomlöf et al. avaliaram histologicamente em 26 dentes com severo comprometimento periodontal indicados para extração, os efeitos da aplicação subgengival de EDTA a 24% em associação ou não a raspagem. O EDTA foi mais efetivo quando aplicado após a raspagem, expondo mais fibras colágenas, e, sem a prévia raspagem e alisamento radicular, seu efeito é insuficiente para remover a placa subgengival e atingir seu objetivo. Baseados em seus resultados, os autores concluíram que o gel de EDTA a 24% aplicado durante 2 minutos no ambiente subgengival, pode ser usado como adjunto ao tratamento básico periodontal, uma vez que a placa subgengival tenha sido previamente removida.

Shapira et al. (1996) estudaram o efeito das endotoxinas adsorvidas no cimento, de dentes acometidos pela doença periodontal, na resposta de monócitos humanos. Além disso, verificaram a ação da tetraciclina na remoção dessas toxinas. Vinte dentes humanos extraídos por extensa destruição periodontal e vinte dentes impactados (controle) tiveram a camada de cimento removida com brocas, coletada e congelada. Esse pó de cimento foi acrescido em 2 meios de culturas para monócitos e divididos em dois grupos, cimento sadio e contaminado. Em outra etapa, esse pó de cimento contaminado foi misturado a

concentrações crescentes (10 a 50 mg/ml) de tetraciclina, durante 3 minutos, lavado com solução salina e acrescido também em meios de cultura para monócitos. Os autores concluíram que os extratos de cimento contaminados, mesmo em concentrações baixas de 0,5 mg/ml, aumentaram em 10 vezes a secreção de TNF alfa e IL-1 beta pelos monócitos. A tetraciclina, em concentrações a partir de 50 mg/ml, atuou como potente inibidor de secreção de TNF α , sendo este mais um mecanismo importante de ação desta droga na terapia periodontal favorecendo sua indicação.

Em um estudo com sonda eletrostática, Atila e Baylas (1996) analisaram a morfologia e o conteúdo mineral da superfície do cimento após raspagem e aplicação tópica de ácido cítrico, cloridrato de tetraciclina e cloridrato de minociclina. Os resultados sugeriram que todos os agentes condicionadores causaram desmineralização da superfície do cimento, mas não removeram todo o cimento hipermineralizado resultante da contaminação radicular, uma vez que, mesmo após o condicionamento, os dentes antes contaminados ainda apresentavam conteúdo mineral mais elevado que o grupo controle, constituído por dentes sadios. Assim, concluíram que o mais importante é remover mecanicamente o cimento alterado que aplicar agentes condicionadores na raiz.

Em um estudo por meio de MEV, Babay (1997) avaliou os efeitos da irrigação ultrasônica antes e após o condicionamento radicular

com ácido cítrico ou tetraciclina HCl. O trabalho constou de 6 grupos com cinco dentes extraídos cada: 1) Irrigação com solução salina; 2) Irrigação com solução salina + aplicação de ácido cítrico; 3) Irrigação com solução salina + aplicação de tetraciclina; 4) Irrigação ultrasônica; 5) Irrigação ultrasônica + aplicação de ácido cítrico e 6) Irrigação ultrasônica + aplicação de tetraciclina. Após o uso de ácido cítrico e tetraciclina, as amostras foram novamente irrigadas com solução salina ou irrigação ultrasônica. Os resultados indicaram que apesar dos grupos 2, 3 e 4 serem efetivos na remoção de *smear layer*, a irrigação ultrasônica associada à desmineralização da superfície dentinária com ácido cítrico, foi o método mais efetivo para exposição de fibrilas colágenas.

Em um relato clínico, Ben-Yehouda (1997) reportou um caso de reabsorção radicular cervical progressiva de um paciente do sexo feminino, em um procedimento regenerativo periodontal bem sucedido, onde a tetraciclina foi empregada na desmineralização radicular. O autor sugeriu a avaliação cuidadosa do paciente e das condições locais, para indicação da aplicação de substâncias desmineralizantes após o alisamento radicular, na tentativa de formação de nova inserção.

Blomlöf et al. (1997) avaliaram o efeito de diferentes concentrações do gel de EDTA na remoção de *smear layer* e na exposição de fibras colágenas. Dentes extraídos por extenso comprometimento periodontal foram raspados e as amostras, obtidas da região cervical, foram condicionadas com EDTA nas concentrações de

1,5%, 5%, 15% e 24% por 2 minutos. Baseado nos resultados, os autores concluíram que as concentrações de EDTA mais efetivas para remoção de *smear layer* e exposição de fibrilas colágenas, dentro de um período de tempo clinicamente aceitável, foram as de 15% e 24%.

Isik et al., ainda em 1997, avaliaram em MEV diferentes modos de aplicação do cloridrato de tetraciclina, em superfícies dentinárias de terceiros molares impactados. A concentração escolhida foi de 50 mg/ml, aplicada por 5 minutos, nos seguintes modos: I) Imersão na solução; II) Passiva, aplicação tópica com auxílio de bolas de algodão umedecidas; III) Fricção por meio de bolas de algodão; IV) Pincel e V) Irrigação com soro fisiológico (controle). Os autores verificaram presença de *smear layer*, túbulos obstruídos e ausência de fibras colágenas nas amostras do grupo controle. Já nos grupos experimentais, foi observada remoção dos detritos com abertura dos túbulos dentinários e exposição de fibras colágenas. Estatisticamente, a fricção vigorosa mostrou os melhores resultados. Dessa forma, os autores concluíram que a fricção da solução de tetraciclina com bolas de algodão é a técnica de escolha devido a maior exposição de fibras colágenas.

Em 1997, Sterrett et al. avaliaram a concentração e o tempo ideal de aplicação do cloridrato de tetraciclina. Molares bovinos tiveram a camada de cimento removida, com broca esférica, nas superfícies lingual e vestibular. Uma depressão no centro da superfície foi realizada para que a substância empregada não escorresse. O controle positivo foi a

aplicação de uma solução de ácido cítrico a 30% e o negativo solução fisiológica. As concentrações de tetraciclina utilizadas foram: 25, 50, 75, 100, 125 e 150 mg/mL. Os tempos de aplicação foram 1, 3 e 5 minutos. Após os períodos estabelecidos, três hastes flexíveis de algodão foram utilizadas, para cada amostra, para coletar a solução remanescente na depressão. As hastes foram colocadas em 2 mL de água Omega 18 molar para análise em espectrofotometria atômica de absorção. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as concentrações de 25 e 50 mg/mL em todos os tempos. Para os demais grupos, os tempos de 3 e 5 minutos promoveram maior desmineralização do que o tempo de 1 minuto. Todos os grupos promoveram menor desmineralização do que a solução de ácido cítrico a 30%.

Avaliando os trabalhos publicados na literatura a respeito do condicionamento radicular, Mendes et al. (1998) verificaram alto grau de discordância entre os resultados e atribuíram este fato a alguns fatores como: tempo de uso da substância, técnica de aplicação, tempo e condições de armazenamento da substância, concentração utilizada, grau de adaptação do retalho, estabilização da ferida cirúrgica, extensão da instrumentação mecânica e falta de padronização dos sítios. Os autores acreditam que apesar do condicionamento apresentar potencial biológico, nem sempre mostra resultados clínicos favoráveis pela negligência com a técnica.

Bergenholtz e Babay (1998) avaliaram por meio de MEV, a textura radicular de dentes extraídos por comprometimento periodontal após aplicação de diferentes agentes condicionantes. As substâncias empregadas foram: solução saturada de ácido cítrico (pH 1.0), solução saturada de tetraciclina HCl (pH 1.8), solução de EDTA a 8% e solução salina. O tempo e o modo de aplicação das substâncias também foram variados. Segundo os autores, a superfície radicular deveria ser primeiramente limpa, polida, friccionada com solução salina ou algum agente ácido por pelo menos 10 segundos e depois exposta ao EDTA 8% por 40 segundos. Dessa forma, a exposição ao EDTA promoveria uma superfície biologicamente favorável à proliferação de fibroblastos e aumentaria a possibilidade de regeneração de superfícies radiculares expostas. E de acordo com o estudo, estas sugestões deveriam ser testadas clinicamente.

Também em 1998, Mayfield et al. avaliaram clinicamente o resultado do condicionamento da superfície radicular, com gel de EDTA por 3 minutos, em defeitos infra-ósseos tratados por cirurgia a retalho convencional. Trinta e seis pacientes com defeito ósseo ≥ 5 mm de profundidade foram avaliados. A conclusão foi que estatisticamente não houve diferenças no resultado clínico entre o grupo condicionado com EDTA quando comparado com o grupo onde foi feita apenas irrigação com soro fisiológico (controle).

Delazari et al. (1999) avaliaram em MEV, o efeito do cloridrato de tetraciclina tanto na remoção de *smear layer* quanto na formação da rede de fibrina. Vinte e dois dentes humanos uniradiculares, com indicação para exodontia por comprometimento periodontal severo, foram divididos em 4 grupos: 1) Irrigação com soro fisiológico; 2) Aplicação durante 4 minutos de TTC HCl a 50 mg/mL por meio de fricção com bolas de algodão; 3) Soro fisiológico + imersão em Tripsina 1% por 20 minutos e 4) Aplicação de TTC HCl como descrito + imersão em Tripsina 1% por 20 minutos. Nos Grupos 1 e 2, as raízes foram acessadas por meio de cirurgia a retalho e raspadas manualmente antes dos tratamentos descritos, logo após a aplicação do soro fisiológico e da tetraciclina, o retalho foi reposicionado coronalmente por 20 minutos antes da extração, para permitir completa formação e estabilização do coágulo. Já nos Grupos 3 e 4, os dentes foram extraídos, raspados imediatamente e os tratamentos descritos foram empregados. Nos Grupos 1 e 2, foi avaliada a formação do coágulo e ambos mostraram superfícies uniformemente cobertas por células sanguíneas. Já os Grupos 3 e 4, foram utilizados para avaliar o grau de *smear layer* residual, desta forma, após aplicação de soro fisiológico, a superfície ainda se apresentava recoberta por resíduos irregulares, já após aplicação de tetraciclina, os túbulos dentinários estavam limpo, abertos e as fibras colágenas expostas. Diante dos resultados, os autores concluíram que o uso do

cloridrato de tetraciclina não influencia na adesão de elementos sanguíneos.

Ainda em 1999, Lan et al. avaliaram a capacidade de adesão e síntese protéica de fibroblastos gengivais humanos, após exposição a diferentes meios de cultura contendo várias concentrações de ácido cítrico, simulando uma acidose extracelular. Além disso, os pesquisadores testaram a citotoxicidade de uma solução contendo citrato de sódio, o qual poderia ser usado para neutralizar o pH das soluções contendo ácido cítrico. A adição do ácido ao meio diminuiu seu pH e a incubação dos fibroblastos nestas placas gerou os seguintes dados após 3 horas: pH 5,2 levou a lise de 47% das células; pH 3,8 levou a 90% de morte celular; $\text{pH} \leq 2,3$ levou a morte instantânea das células. O citrato de sódio, mesmo após 3 horas de incubação exerceu baixa toxicidade sobre os fibroblastos. Os resultados mostraram que a acidez extracelular promovida pelo ácido é tóxica para os fibroblastos e que seu uso como descrito na literatura (pH 1,0), deve ser considerado previamente a sua aplicação clínica.

Em 2000, Isik et al. avaliaram a superfície dentinária após emprego de diferentes concentrações e tempos de aplicação do cloridrato de tetraciclina. Quarenta e oito amostras foram obtidas de terceiros molares e distribuídas em grupos de acordo com a concentração: soro fisiológico (controle), 10, 25, 50, 75, 100, 125 e 150 mg/ml) e tempo de aplicação: 1, 3 e 5 minutos. As substâncias foram aplicadas por fricção

com bolas de algodão, umedecidas nas soluções a cada 30 segundos. A presença de *smear layer* e a morfologia dos túbulos dentinários foram avaliadas e descritas após análise em MEV. Os resultados indicaram que independente do tempo de aplicação e das concentrações empregadas, o cloridrato de tetraciclina removeu *smear layer* de forma eficiente.

Zaman et al. (2000) realizaram um estudo para avaliar a aderência e orientação de células do ligamento periodontal, sobre dentina e cimento de superfícies radiculares após condicionamento químico, para isso coletaram dentes extraídos devido à doença periodontal. Após raspagem, metade da superfície radicular teve a camada de cimento preservada e a outra metade foi removida para expor a dentina subjacente. As amostras foram obtidas do terço médio radicular e divididas nos seguintes grupos: 1) Solução saturada de ácido cítrico (pH 1,2); 2) gel de EDTA 24% (pH 7,0); 3) Solução de cloridrato de tetraciclina a 100 mg/ml (pH 2,0) e 4) Nenhum tratamento (controle). Os espécimes foram imersos nas soluções durante 3 minutos e avaliadas em microscópio de contraste de fase após 1, 3 e 7 dias do tratamento. Quando comparada cada substância, variando apenas a superfície (cimento ou dentina), nenhuma diferença foi encontrada. Já entre substâncias, o gel de EDTA e o ácido cítrico, quando aplicados em dentina, mostraram-se melhores, na capacidade de adesão de células do ligamento, do que a tetraciclina em dentina, o controle e a aplicação das três substâncias em cimento. Os autores concluíram que o EDTA e o

ácido cítrico podem melhorar a adesão e orientação das células do ligamento.

Ainda em 2000, Baker et al. após analisar vários relatos na literatura de que a estabilização do coágulo é um fator essencial para a formação de uma inserção conjuntiva, avaliaram a adsorção e adesão de elementos sanguíneos sobre superfícies radiculares desmineralizadas pelo ácido cítrico. Superfícies dentinárias humanas foram divididas em 4 grupos: raspagem; raspagem + imersão em ácido cítrico; raspagem + tecido sanguíneo e raspagem + ácido cítrico + tecido sanguíneo. Após analisar as fotografias obtidas em MEV, os autores verificaram que as superfícies tratadas com ácido cítrico estavam livres de detritos e que a rede de fibrina estava diretamente inserida nelas. Já nas amostras não condicionadas, a presença de *smear layer* dificultou a formação e a estabilização da rede de fibrina.

Pilatti (2001) realizou um estudo com a finalidade de verificar a influência do tempo, do modo de aplicação e da concentração do gel de EDTA, no grau de remoção de *smear layer* da superfície dentinária. O terço cervical, de dentes extraídos por extensa destruição periodontal, foi raspado para remoção de cimento e, em seguida, os seguintes tratamentos foram empregados: irrigação com soro fisiológico (controle) e aplicação de gel de EDTA a 5%, 10%, 15%, 20% e 24%, por método de fricção ou topicamente com bolas de algodão, durante 1, 2, 3 minutos ou 3 minutos, realizando irrigação com soro fisiológico a cada 1 minuto

(1+1+1 minutos). Segundo o autor, a aplicação ativa foi a melhor, exceto para a concentração de 5% e que o uso por 3 minutos contínuo foi mais efetivo que 1 minuto.

Babay (2002) coletou 24 dentes humanos extraídos devido a doença periodontal severa e delimitou suas porções saudáveis e doentes. Nas áreas afetadas pela doença realizou os seguintes tratamentos: nenhum tratamento (controle); raspagem com ultrassom; tratamento com cloridrato de tetraciclina sem realizar qualquer tipo de limpeza; e raspagem com ultrassom seguida da aplicação de TTC HCl. Em seguida, fibroblastos gengivais humanos foram adicionados sobre as amostras e incubados durante 72 horas para avaliação em MEV. As superfícies tratadas por meio de ultrassom, associado ou não a tetraciclina, apresentaram número significativamente maior de fibroblastos aderidos. Segundo o autor, nenhuma célula foi encontrada nas superfícies radiculares não tratadas nem nas raízes apenas condicionadas com o cloridrato.

Avaliando o grau de remoção de *smear layer* e a exposição de fibras colágenas, na tentativa de encontrar o tempo, modo de aplicação e concentração ideal para aplicação do cloridrato de tetraciclina, Abi Rached (2003) utilizou dentes humanos extraídos, que tiveram o cimento removido por fresa em alta rotação e raspados com 50 movimentos por meio de curetas do tipo Gracey 5/6. As 225 amostras obtidas foram divididas nos grupos que seguem: 1) Soro fisiológico

(controle); 2) TTC HCl 10 mg/ml; 3) TTC HCl 25 mg/ml; 4) TTC HCl 50 mg/ml e 5) TTC HCl 75 mg/ml. Em todos os grupos as soluções foram aplicadas durante 1, 2 e 3 minutos nas formas passiva, tópica (com bolas de algodão); fricção ativa com bolas de algodão e fricção suave com o auxílio de um pincel. As substâncias foram renovadas a cada 30 segundos. Os resultados mostraram que as concentrações de 50 mg/ml e 75 mg/ml foram as mais efetivas e que a aplicação passiva (tópica) foi insatisfatória para remoção de *smear layer* e exposição de fibras colágenas. Quanto ao tempo de aplicação, nenhuma diferença estatística foi detectada entre 2 e 3 minutos, mas ambos foram superiores a aplicação por 1 minuto.

Theodoro (2003), avaliou a adesão de elementos sanguíneos sobre superfícies radiculares irradiadas com laser de Er:YAG e Diodo e a ação destes lasers sobre as superfícies irradiadas. Cento e vinte amostras de dentes humanos com doença periodontal foram raspadas com instrumentos manuais. O trabalho constou de 6 grupos. O Grupo 1 (controle) não recebeu nenhum tratamento; o Grupo 2 aplicação tópica de EDTA 24%; o Grupo 3 irradiação com laser de Er:YAG (8 J/cm²); o Grupo 4 foi irradiação com laser de Er:YAG (14,2 J/cm²); o Grupo 5 irradiação com laser de Diodo (1,0 W) e o Grupo 6 irradiação com laser de Diodo (1,2 W). Após receberem os tratamentos em 10 amostras de cada grupo foi depositado tecido sanguíneo e as outras 10 amostras não receberam. As fotomicrografias obtidas foram avaliadas

através de dois índices: adesão de elementos sanguíneos e de morfologia da superfície radicular. Os resultados demonstraram que com relação a adesão de elementos sanguíneos, não houve diferenças estatisticamente significante entre o grupo controle dos tratados com o laser de Er:YAG; O Grupo 5 foi menos efetivo que o controle na adesão de elementos sanguíneos e o Grupo 2 foi o menos efetivo na adesão de elementos sanguíneos. Concluiu-se que o laser de Er:YAG pode ser utilizado sobre a superfície radicular nos parâmetros utilizados no presente estudo sem promover alterações na adesão do coágulo apesar de provocar microrugosidades na superfície radicular; o EDTA e o laser de Diodo podem inibir a adesão do tecido sanguíneos na superfície radicular apesar de promover uma superfície mais regular.

Em 2004, Sousa avaliou diferentes marcas de EDTA a 24% na remoção de *smear layer* e exposição de fibras colágenas da superfície dental. Em raízes de dentes extraídos por doença periodontal, onde o cimento foi removido com brocas diamantadas, e a dentina raspada com curetas tipo Gracey, os seguintes tratamentos foram empregados: A) aplicação de soro fisiológico (controle); B) EDTA (Farmácia Santa Paula); 3) EDTA associado ao detergente Texapon (Farmácia Santa Paula); 4) EDTA (Pref Gel, Biora); 5) EDTA (E.D.T.A. Gel, Biodinâmica). Todas as substâncias foram aplicadas por meio tópico, fricção suave com pincel e fricção vigorosa com bolas de algodão, durante 1, 2 e 3 minutos. O autor conclui que em todas as marcas exceto para a Biodinâmica, que

apresentou os piores resultados, a aplicação do gel de EDTA a 24% pelo método de fricção suave (pincel) foi o mais efetivo, independente do tempo de utilização.

Baker et al. (2005) avaliaram o efeito de proteínas construtoras na adesão do coágulo sobre a superfície dentinária. Dentes humanos extraídos foram raspados para remoção de *smear layer* e a porção cervical foi cortada em blocos de 4x6x1 mm. Os espécimes foram condicionados topicamente com solução saturada de ácido cítrico, gel de EDTA a 24%, albumina de soro bovino e um preparo de proteína da matriz do esmalte. Sangue humano fresco foi depositado sobre as amostras por 20 minutos para garantir a completa formação e estabilização do coágulo. Imediatamente, seguiram processamento laboratorial e análise em MEV. O ácido cítrico limpou totalmente a superfície abrindo os túbulos dentinários, o EDTA ainda deixou restou de *smear layer* na superfície e as duas soluções protéicas não promoveram nenhuma alteração na camada de resíduos. Segundo os autores, a melhor superfície para retenção do coágulo foi a condicionada pelo ácido cítrico. Os espécimes tratados com EDTA apresentaram menor quantidade de coágulo, o qual se soltava facilmente da superfície. Já as superfícies tratadas com proteínas não foram capazes de reter o coágulo. Os autores concluíram que o ideal é o uso de uma substância que remova *smear layer* e exponha fibras colágenas para melhor sustentação do coágulo.

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO

Este estudo tem por objetivo avaliar, por meio de microscopia eletrônica de varredura, o grau de adsorção e adesão de elementos sangüíneos à superfície radicular, após tratamento por meio de raspagem e alisamento radicular associado ou não ao uso de diferentes agentes químicos: ácido cítrico, citrato de sódio, EDTA e cloridrato de tetraciclina.

MATERIAL E MÉTODO

MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo deste projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP (Protocolo CEP-FO/Car. nº10/04). Salientamos que os dentes foram obtidos após aprovação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexos 1 e 2).

Seleção dos dentes

Foram utilizados 75 dentes humanos permanentes, uni ou multirradiculares, extraídos nas clínicas de Cirurgia, Periodontia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. Para inclusão nesta pesquisa, o dente deveria apresentar acometimento periodontal severo (perda de inserção de mais da metade do segmento radicular) e superfície entre a junção cimento-esmalte e ápice radicular íntegra em relação à cárie, abrasão, restaurações e marcas de fórceps devido à extração. Além disso, o paciente não poderia ter feito uso de cigarro em qualquer época de sua vida, uma vez que características como, temperatura subgengival, colonização bacteriana e composição

iônica salivar são diferentes entre pacientes tabagistas e não tabagistas, podendo levar a maior mineralização da superfície radicular (BERGSTRÖM, 2005; VAN WINKELHOFF et al., 2001; ZUABI et al., 1999; TRIKILIS et al., 1999; CUFF et al., 1989).

Preparo dos dentes

Os dentes foram preparados por um único pesquisador de acordo com protocolo descrito a seguir.

Após a exodontia, os dentes foram lavados para remoção de restos de tecidos moles e sangue, sendo em seguida armazenados em água filtrada, sendo esta trocada semanalmente, a fim de evitar acidificação do meio e crescimento exacerbado de microrganismos. Para evitar ressecamento, cada dente foi mantido a temperatura ambiente, em tubo plástico fechado individual (Eppendorf, New England, USA).

O terço cervical mesial e distal das raízes foi delimitado por dois sulcos paralelos, confeccionados com auxílio de broca cilíndrico-cônica diamantada (nº 3203, KG Sorensen, Barueri, SP), um na junção cemento-esmalte e outro aproximadamente 4 mm do mesmo em direção apical (FIGURAS 1 e 2). A área delimitada pelos sulcos foi raspada e aplainada com 50 movimentos de tração cérvico-oclusal, por intermédio de curetas manuais novas (Gracey 5/6, Hu-Friedy, Illinois, USA), por um

único operador, para garantir a formação de *smear layer* (FIGURA 3) (SOUSA, 2004; ABI RACHED, 2003; THEODORO, 2003; BATISTA, 2002). A seguir, com auxílio de um disco diamantado montado em baixa rotação (KG Sorensen, Barueri, SP), foram obtidos um fragmento da superfície radicular mesial e um da distal, medindo aproximadamente 1 mm de espessura e 4 mm x 3 mm de largura e comprimento (FIGURAS 4 e 5). As amostras foram removidas a partir de 1 mm apical a junção cemento esmalte, totalizando 2 amostras por dente, sendo mantidas todas no mesmo frasco até o dia do tratamento da superfície.



FIGURA 1 – Delimitação do sulco na junção cemento-esmalte.



FIGURA 2 – Delimitação do sulco 4 mm apical ao primeiro.

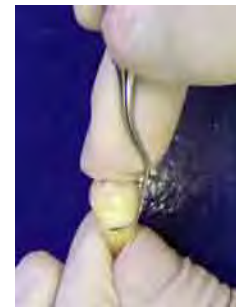


FIGURA 3 – Raspagem da área delimitada.



FIGURA 4 – Corte com disco diamantado para obtenção da amostra.



FIGURA 5 – Amostras finais da superfície radicular

Sobre as amostras as seguintes substâncias foram aplicadas (15 dentes/grupo):

- **Grupo I** – amostras que receberam irrigação com 10 mL de soro fisiológico (controle).

- **Grupo II** – amostras que receberam tratamento com gel de EDTA 24% (Farmácia Santa Paula, São Paulo, Brasil), aplicado com auxílio de um pincel, umedecido a cada 30 segundos no gel, durante 3 minutos (SOUSA, 2004; BLOMLÖF et al., 1997).

- **Grupo III** – amostras que receberam tratamento com ácido cítrico 25% (Farmácia Santa Paula, São Paulo, Brasil), aplicado topicamente com auxílio de bolas de algodão, umedecidas a cada 30 segundos na solução, durante 3 minutos (STERRETT et al., 1993, 1995).

- **Grupo IV** – amostras que receberam tratamento com solução de cloridrato de tetraciclina (Farmácia Santa Paula, Araraquara, São Paulo, Brasil), na concentração de 50 mg/mL, aplicada vigorosamente por fricção, com auxílio de bolas de algodão, umedecidas na solução a cada 30 segundos, durante 3 minutos (ISIK et al., 1997, 2000; ABI RACHED, 2003).

- **Grupo V** - espécimes receberam tratamento com solução de citrato de sódio na concentração de 30% (Farmácia Santa Paula, São Paulo, Brasil), aplicada com auxílio de um pincel, umedecido na solução a cada 30 segundos, durante 3 minutos (LEITE et al., 2005).

Após o tratamento da superfície, as amostras foram irrigadas com 10mL de solução fisiológica para remoção das substâncias utilizadas. Para a realização desses tratamentos as amostras foram mantidas em posição por intermédio de um suporte plástico e cera utilidade.

Visualização das fibras colágenas

Uma das duas amostras obtidas de cada dente, após tratamento com as substâncias descritas, foi colocada em um dos orifícios de uma placa de acrílico contendo 96 poços no total, para verificar se ocorreu biomodificação radicular isto é, se houve remoção de *smear layer* e exposição de fibras colágenas. As mostras foram submetidas à desidratação em série crescente de álcoois etílico (30%, 50%, 70%, 80%, 95%, 100%), permanecendo submersas por uma hora em cada. Esta desidratação é necessária para a aplicação do hexametildisilazane – HMDS (Sigma, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA), substância fundamental para visualizar, por meio de impregnação, as fibras colágenas expostas.

Em seguida, foi realizada a aplicação do HMDS na placa de acrílico. Primeiramente, durante 30 minutos, cada orifício da placa recebeu 0,75 µL de HMDS + 0,75 µL de álcool absoluto medidos com

pipeta automática (Boeco, Hamburg, Germany). Depois de decorrido esse tempo, a solução foi retirada, e os poços foram preenchidos com 1mL de HMDS puro, onde as amostras permaneceram por 10 minutos. Toda a manipulação do HMDS foi realizada em capela de ventilação acionada, pois é um produto tóxico dotado de propriedades cancerígenas.

Finalizada a aplicação do HMDS, cada amostra foi armazenada em cassete individual forrado com papel filtro, no intuito de absorver o produto utilizado. Todos os cassetes permaneceram durante 48 horas dentro de placas de petri fechadas para secagem. Logo após, as amostras foram submetidas à avaliação em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Aplicação do sangue

Sobre a outra amostra obtida de cada dente, após a aplicação dos agentes químicos, uma camada de tecido sangüíneo foi depositada. A retirada do sangue e realização dos exames de coagulação ocorreu no Laboratório de Hematologia do Núcleo de Atendimento à Comunidade, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP, com auxílio de uma enfermeira-padrão e um farmacêutico-bioquímico. O tecido sangüíneo foi coletado da circulação periférica de um paciente jovem, do sexo masculino, sem doenças sistêmicas detectáveis em hemograma completo e exames de coagulação (tempo de coagulação

– TC –, tempo de pró-trombina – TP – e tempo de tromboplastina ativada – TTPA –) por meio de uma seringa de 5 mL e agulha hipodérmica (Becton Dickinson, New Jersey, USA) (FIGURA 6) (Anexo 3).

A aplicação do sangue e o processamento laboratorial da amostra seguiram o protocolo estabelecido por Baker et al. (2000). O sangue foi depositado com auxílio de seringa hipodérmica (1 gota por amostra) sobre as amostras (FIGURA 7) e mantido imóvel por 20 minutos em câmara plástica humidificadora. Todo o procedimento foi realizado em ambiente fechado sob temperatura de 37°C (NUKTON et al., 2002; FUKUDA et al., 2000; WEYLAND et al., 1994).



FIGURA 6 – Punção venosa periférica.



FIGURA 7 – Deposição do sangue.

Em seguida os espécimes foram lavados 3 vezes durante 5 minutos, com solução de tampão fosfatado pH 7,0 (PBS), em recipiente de vidro, sob leve agitação mecânica – aproximadamente 60 r.p.m. (Mini-Rocker Shaker, Boeco, Hamburg, Germany). A seguir, as amostras foram armazenadas em cassetes plásticos e fixadas em solução de formaldeído 1% em solução de tampão fosfatado durante 15 minutos. Após 3 lavagens

de 5 minutos com solução de tampão fosfatado sob leve agitação, foram incubadas por 10 minutos em 0,02M de glicina em solução de tampão fosfatado e lavadas novamente por 3 vezes durante 5 minutos. A seguir, foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em solução de tampão fosfatado durante 30 minutos e lavadas novamente como descrito anteriormente. Na sequência, as amostras foram desidratadas em série crescente de álcoois etílico: 25%, 50%, 75%, 95% durante 10 minutos em cada solução, passando por 3 lavagens finais de 10 minutos cada, em etanol a 100% e secagem em máquina de ponto crítico de CO₂ (Baltec CPD 030, Flórida, USA). As amostras seguiram para avaliação em microscopia eletrônica de varredura. A Tabela 1 ilustra a distribuição das amostras de acordo com o tratamento empregado.

Tabela 1 – Distribuição das amostras em cada um dos grupos de acordo com o tratamento a ser empregado

Grupo	Controle	Ácido cítrico	Citrato de sódio	EDTA	Tetraciclina	Total
Tratamento						
HMDS	15	15	15	15	15	75
Sangue	15	15	15	15	15	75
Total	30	30	30	30	30	150

Avaliação em microscopia eletrônica de varredura

As amostras foram coladas em stubs metálicos e mantidas em dessecador a vácuo (40/35 Sleeve Top Dessicator, Corning, New York, USA) por 24 horas e, em seguida foram metalizadas por recobrimento com liga ouro-paládio (Balt-Tec SCD-050, Flórida, USA), durante 120 segundos. Os espécimes foram então levados para análise em microscópio eletrônico de varredura (Jeol-JSM T330-A, JEOL Technics Co., Tokyo, Japan), operado a 20kV e obtidas fotomicrografias com auxílio de filme Neopan Acros (Fuji Film 120 SS, Tokyo, Japan). Nas amostras onde foi aplicado o sangue as fotomicrografias foram obtidas nos aumentos de 500 e 1000X da área central da amostra, já naquelas onde foi aplicado o HMDS, o aumento utilizado foi de 2000X.

Análise das fotomicrografias

As fotomicrografias foram analisadas por 1 examinador previamente calibrado, treinado e sem conhecimento quanto à identificação das amostras como utilizado por Sousa, 2004; Batista, 2002; Abi Rached, 2003; Pilatti, 2001; Sampaio, 1999. Para as amostras que foram apenas condicionadas, ou seja, o tecido sangüíneo não foi aplicado, o examinador realizou a descrição morfológica da superfície por

meio do Índice de Biomodificação Radicular (IBR), criado para aplicação no presente estudo.

- (1) – presença de cimento/dentina e exposição de fibras colágenas;
- (2) – presença de cimento/dentina sem exposição de fibras colágenas;
- (3) – presença de *smear layer*.

Para a análise das fotomicrografias das amostras que receberam o tecido sanguíneo, foi utilizado um Índice de Adesão de Elementos Sanguíneos (IAES) descrito por Theodoro (2003):

- (0) ausência de rede de fibrina e de células sangüíneas;
- (1) escassa rede de fibrina e/ou de células sangüíneas;
- (2) moderada quantidade de células sangüíneas e rede de fibrina mais fina com pequeno entrelaçamento;
- (3) densa rede de fibrina com grande entrelaçamento e células sangüíneas aprisionadas.

Para cada fotomicrografia, o examinador realizou 3 leituras com intervalo mínimo 7 dias entre elas, e após a tabulação dos dados, foi selecionado o índice de maior frequência entre as 3 análises, como sendo

o índice proposto para a fotomicrografia (Anexo 4). A análise de concordância intra-examinador foi realizada por meio de teste Kappa com 5% de nível de significância.

Análise estatística

Por não apresentarem distribuição normal e homogeneidade, foram utilizados métodos não paramétricos para análise dos dados e o valor adotado como nível de significância foi de 0,05. As variáveis ordinais dependentes “Índice de Adesão de Elementos Sanguíneos” e “Índice de Biomodificação Radicular” foram avaliadas segundo os grupos experimentais, empregando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Em caso de valor de $p \leq 0,05$, a comparação entre os postos médios das amostras foi efetuada, utilizando-se o teste de Mann-Whitney (GraphPad Prism 4.0, GraphPad Software Inc., USA).

Além de avaliar o efeito dos tratamentos propostos pelos dois índices supracitados, foi realizada uma análise para avaliar a possível correlação entre adesão de elementos sanguíneos e morfologia da superfície radicular tratada. Para isso, o Índice de Biomodificação Radicular (IBR) foi dicotomizado em termos de exposição de fibras colágenas (1=1; 2 e 3=0) e analisado por meio de teste Qui-quadrado com 5% de nível de significância.

RESULTADO

RESULTADO

De forma a ilustrar melhor os resultados obtidos a partir dos índices atribuídos a cada fotomicrografia (Anexo 4), esta seção será apresentada em duas partes: primeiramente uma descrição dos achados nas amostras e as fotomicrografias obtidas, e em seguida, a análise estatística para o Índice de Adesão de Elementos Sangüíneos, bem como para o Índice de Biomodificação Radicular.

Análise Descritiva

Amostras não submetidas à deposição de tecido sangüíneo (Gráfico 1):

No Grupo I (controle), representado pela instrumentação mecânica manual seguida apenas por irrigação com água destilada, foi unânime o IBR 3 na leitura das fotomicrografias (15) (Figura 8), caracterizado pela presença de *smear layer*. Foi evidente a irregularidade da superfície e em algumas amostras, as ranhuras produzidas pela instrumentação manual.

As amostras do Grupo II, as quais após instrumentação manual foram submetidas à aplicação do gel de EDTA, apresentaram em

sua maioria (11) IBR 2, caracterizado pela ausência de *smear layer*, porém sem a exposição de fibras colágenas da superfície radicular (Figura 9). Já nas quatro fotomicrografias restantes, foi evidente a remoção de *smear layer* e a exposição de fibras (IBR 1).

Nas amostras do Grupo III, as quais receberam tratamento com ácido cítrico após a raspagem, pôde-se observar em nove fotomicrografias a remoção de *smear layer* e conseqüente exposição de fibras colágenas (IBR 1) (Figura 10). As demais seis fotomicrografias apresentaram superfície limpa, sem a presença de *smear layer*, porém sem a exposição da matriz colágena, característica do IBR 2.

No Grupo IV, onde as amostras foram submetidas após a raspagem à aplicação de tetraciclina, pôde-se observar unanimidade do IBR 2 nas quinze fotomicrografias analisadas (Figura 11). Assim, apesar da superfície dental não apresentar-se recoberta por *smear layer*, também não foi possível visualizar suas fibras colágenas.

O grupo V, que recebeu aplicação de citrato de sódio após a raspagem, também foi caracterizado pela ausência de *smear layer* recobrindo a superfície, porém este não foi efetivo na exposição de fibras colágenas da estrutura dental (IBR 2) (Figura 12).

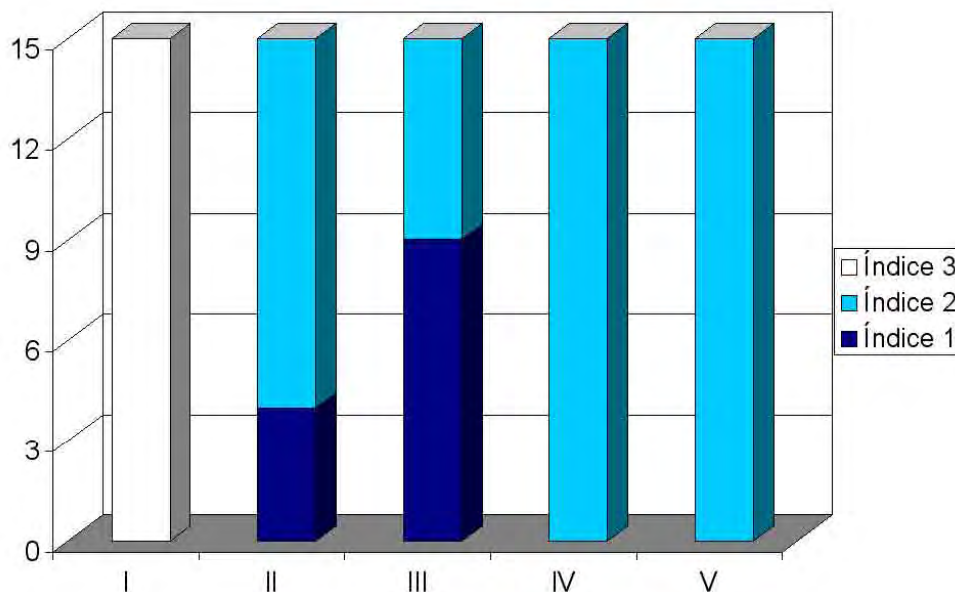


Gráfico 1 – Gráfico representativo da distribuição das amostras para cada Índice de Biomodificação Radicular por grupo experimental.

Amostras submetidas à deposição de tecido sangüíneo (Gráfico 2):

No Grupo I (controle), representado pela instrumentação mecânica manual seguida apenas por irrigação com água destilada, foi observado que a maioria das fotomicrografias (8) apresentou IAES 0 (Figuras 13 e 14), caracterizado pela ausência de rede de fibrina e células sangüíneas aderidas à superfície. A outras seis foi atribuído IAES 1, com poucas células aderidas em escassa rede de fibrina e apenas uma amostra recebeu escore 2, mostrando moderada quantidade de elementos sangüíneos.

Nas amostras do Grupo II, onde após instrumentação manual foram submetidas à aplicação do gel de EDTA, oito receberam escore do IAES 2, com moderada quantidade de células sangüíneas e fina rede de fibrina com pequeno entrelaçamento (Figuras 15 e 16). Três apresentaram escassa quantidade de células (IAES 1) enquanto que em outras quatro, não foi observada a presença de elementos sangüíneos (IAES 0).

As amostras do Grupo III, as quais receberam tratamento com ácido cítrico após a raspagem, apresentaram em sua maioria (7) IAES 3, ou seja, densa rede de fibrina com grande entrelaçamento e células sangüíneas aprisionadas (Figuras 17 e 18). Cinco delas foram caracterizadas pelo IAES 2, com moderada quantidade de elementos sangüíneos, duas pela escassez de células e rede de fibrina enquanto que uma não apresentou elementos aderidos à superfície.

No Grupo IV, onde as amostras foram submetidas após a raspagem à aplicação de tetraciclina, nove amostras apresentaram IAES 1, denotando escassa rede de fibrina e/ou de células sangüíneas (Figuras 19 e 20) e outras quatro IAES 0, caracterizado pela ausência de elementos sangüíneos. Por outro lado, duas amostras apresentaram IAES 2, com moderada quantidade de células sangüíneas aderidas em fina rede de fibrina.

Já no Grupo V, que recebeu aplicação de citrato de sódio após a raspagem, pôde-se observar que oito amostras apresentaram IAES 0, caracterizado pela ausência de rede de fibrina (Figuras 21 e 22). Outras cinco fotomicrografias receberam escore do IAES 1, denotando escassa rede de fibrina e/ou de células sangüíneas e as últimas duas apresentaram moderada quantidade de células sangüíneas, representado pelo IAES 2, mostrando moderada quantidade de elementos sangüíneos.

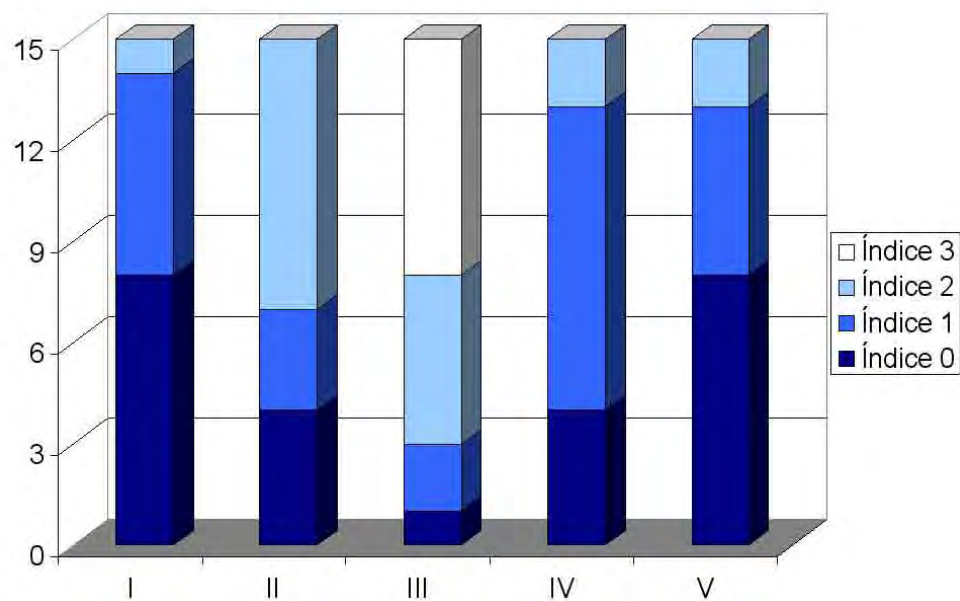


Gráfico 2 – Gráfico representativo da distribuição das amostras para cada Índice de Adesão de Elementos Sangüíneos por grupo experimental.

Amostras não submetidas à deposição de tecido sangüíneo:

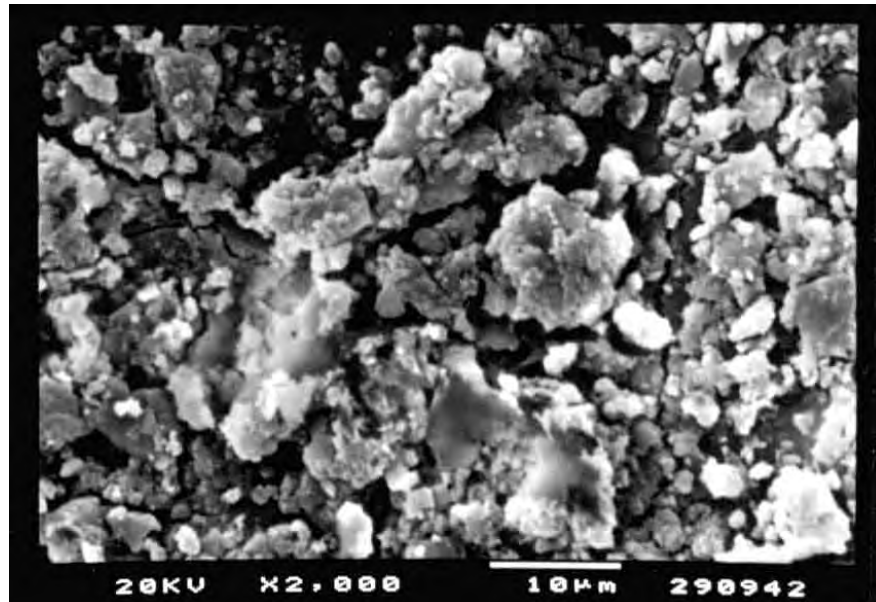


FIGURA 8 – Grupo I (controle). Superfície radicular coberta por *smear layer* (IBR 3). Aumento original 2000X.

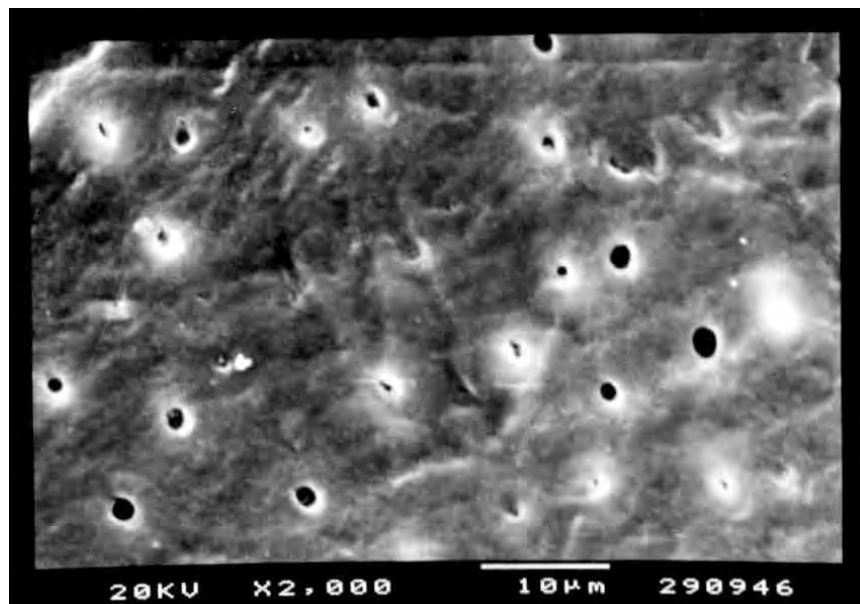


FIGURA 9 – Grupo II (EDTA). Presença de cimento/dentina sem exposição de fibras colágenas (IBR 2). Aumento original 2000X.

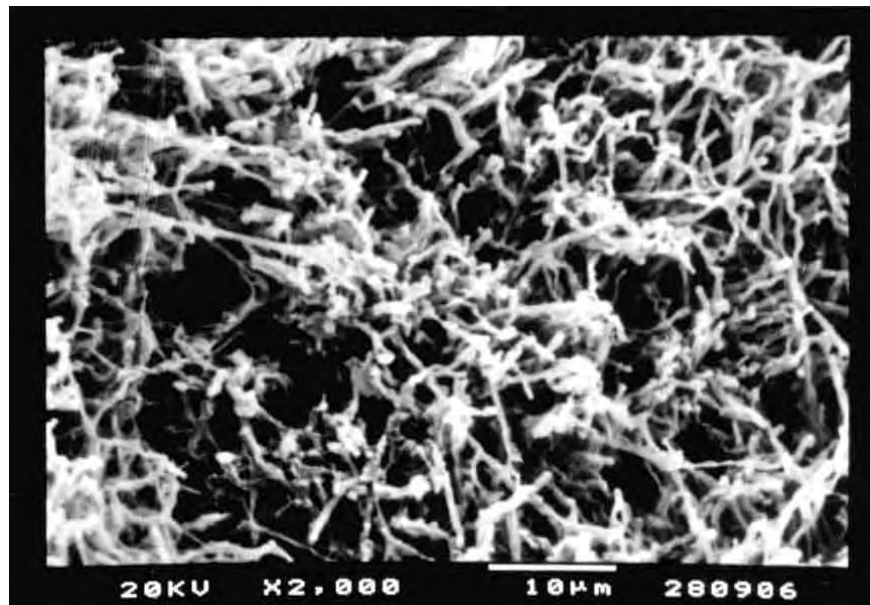


FIGURA 10 – Grupo III (ácido cítrico). Presença de cimento/dentina com exposição de fibras colágenas (IBR 1). Aumento original 2000X.

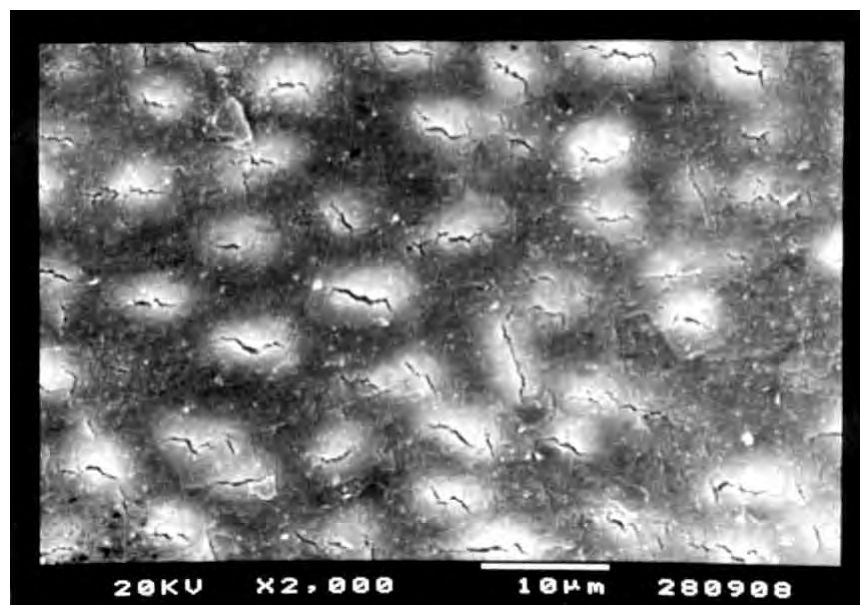


FIGURA 11 – Grupo IV (tetraciclina). Presença de cimento/dentina sem exposição de fibras colágenas (IBR 2). Aumento original 2000X.

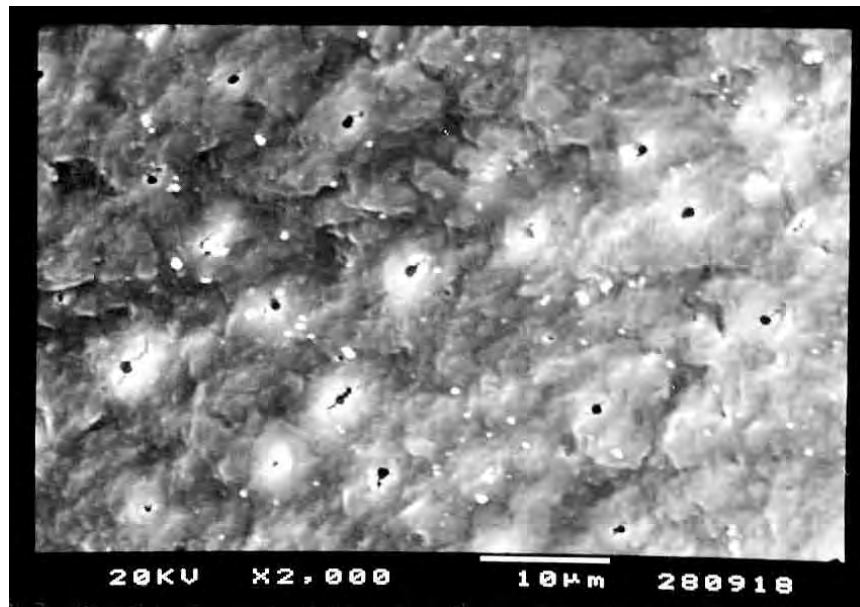


FIGURA 12 – Grupo V (citrato de sódio). Presença de cimento/dentina sem exposição de fibras colágenas (IBR 2). Aumento original 2000X.

Amostras submetidas à deposição de tecido sangüíneo:

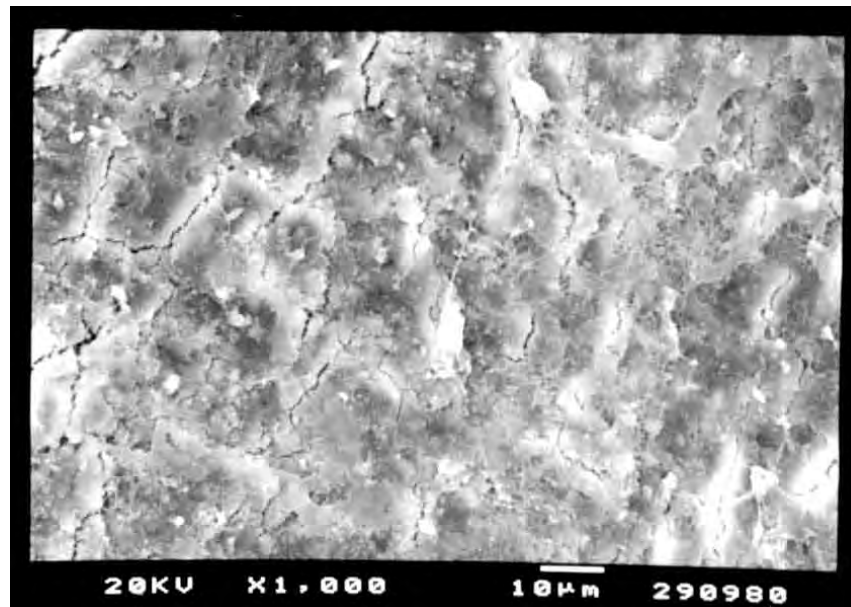


FIGURA 13 – Grupo I (controle). Ausência de rede de fibrina e de células sangüíneas (IAES 0). Aumento original 1000X.

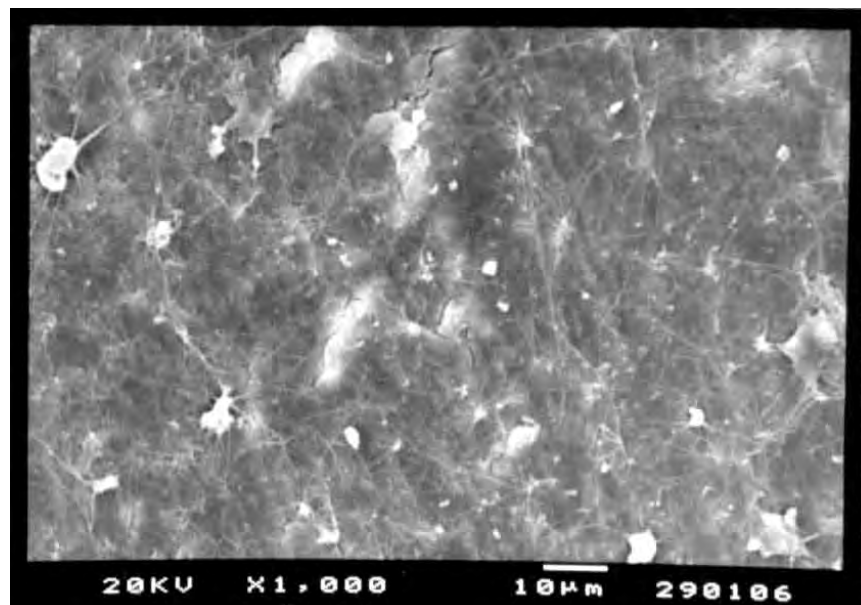


FIGURA 14 – Grupo I (controle). Ausência de rede de fibrina e de células sangüíneas (IAES 0). Aumento original 1000X.

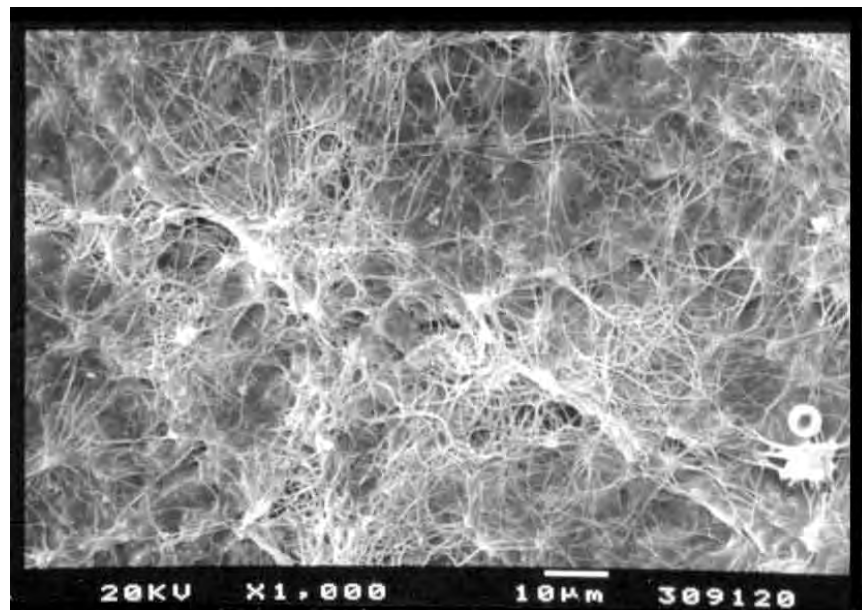


FIGURA 15 – Grupo II (EDTA). Superfície radicular coberta por moderada quantidade de células sangüíneas e rede de fibrina mais fina com pequeno entrelaçamento (IAES 2). Aumento original 1000X.

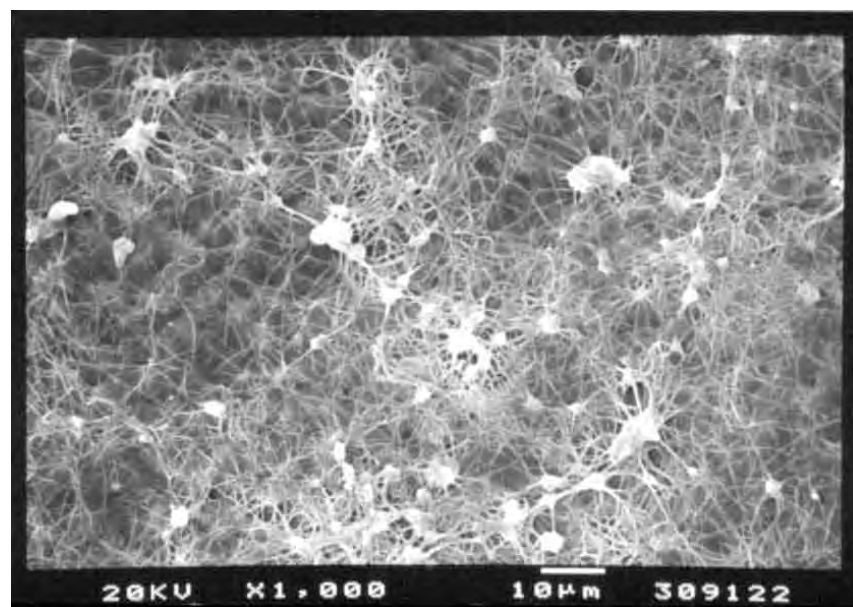


FIGURA 16 – Grupo II (EDTA). Superfície radicular coberta por moderada quantidade de células sangüíneas e rede de fibrina mais fina com pequeno entrelaçamento (IAES 2). Aumento original 1000X.

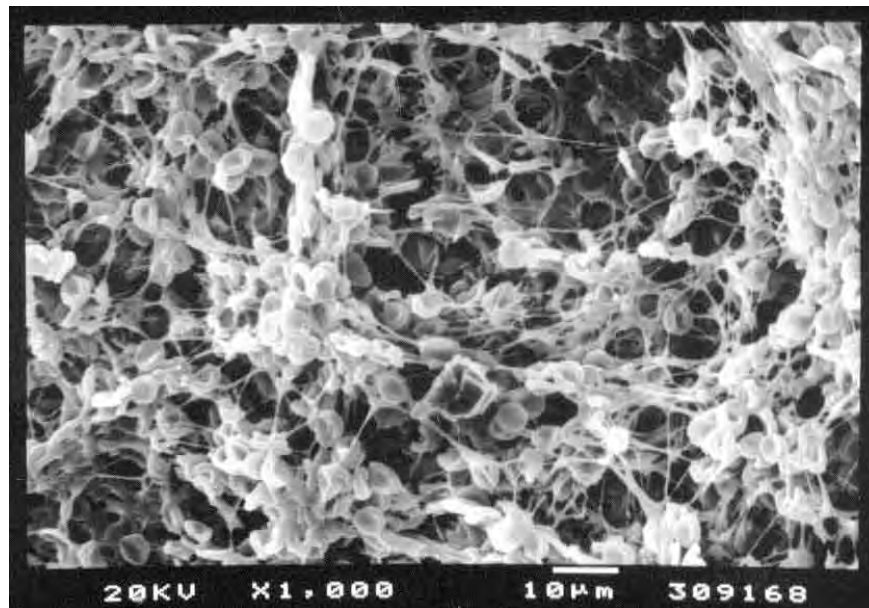


FIGURA 17 – Grupo III (ácido cítrico). Superfície radicular coberta por densa rede de fibrina com grande entrelaçamento e células sangüíneas aprisionadas (IAES 3). Aumento original 1000X.

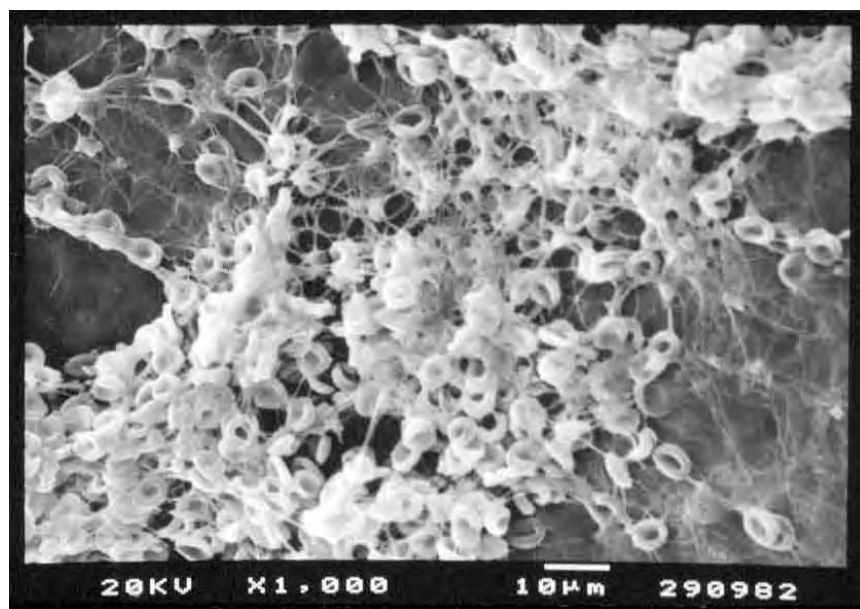


FIGURA 18 – Grupo III (ácido cítrico). Superfície radicular coberta por densa rede de fibrina com grande entrelaçamento e células sangüíneas aprisionadas (IAES 3). Aumento original 1000X.

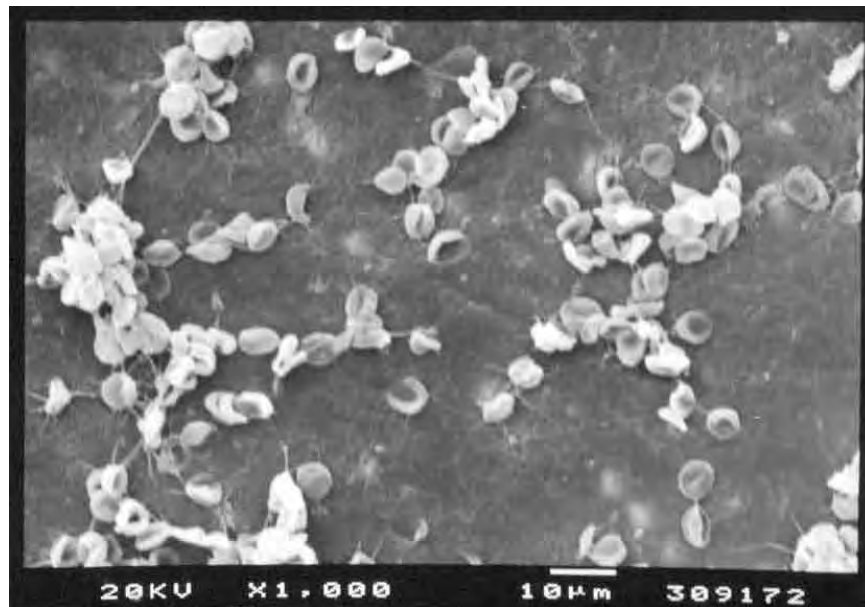


FIGURA 19 – Grupo IV (tetraciclina). Escassa rede de fibrina e de células sangüíneas cobrindo a superfície radicular (IAES 1). Aumento original 1000X.

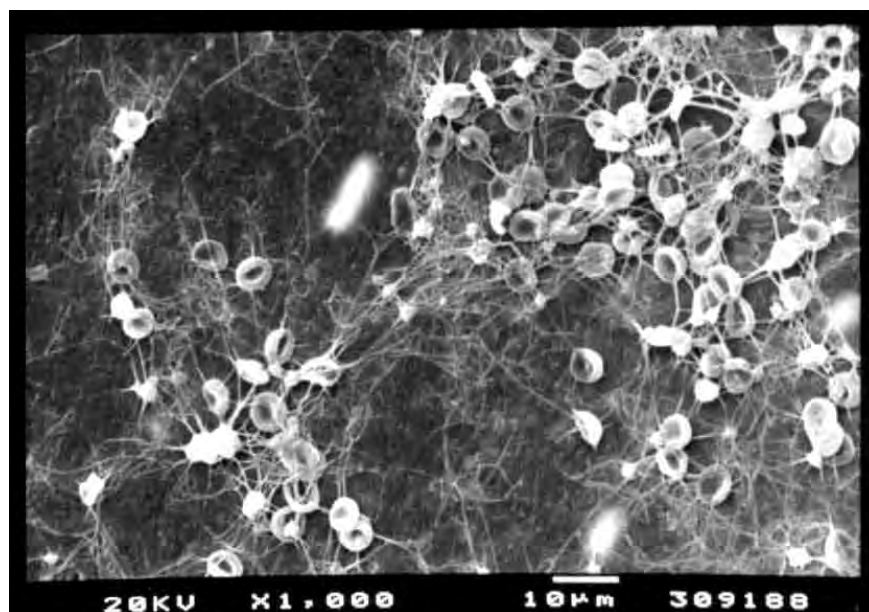


FIGURA 20 – Grupo IV (tetraciclina). Escassa rede de fibrina e de células sangüíneas cobrindo a superfície radicular (IAES 1). Aumento original 1000X.

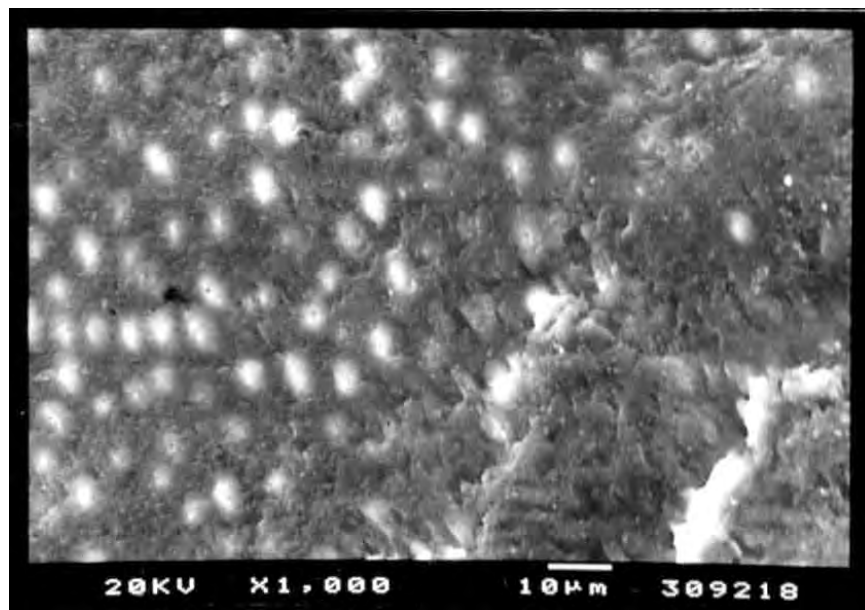


FIGURA 21 – Grupo V (citrato de sódio). Superfície radicular demonstrando ausência de rede de fibrina e de células sangüíneas (IAES 0). Aumento original 1000X.

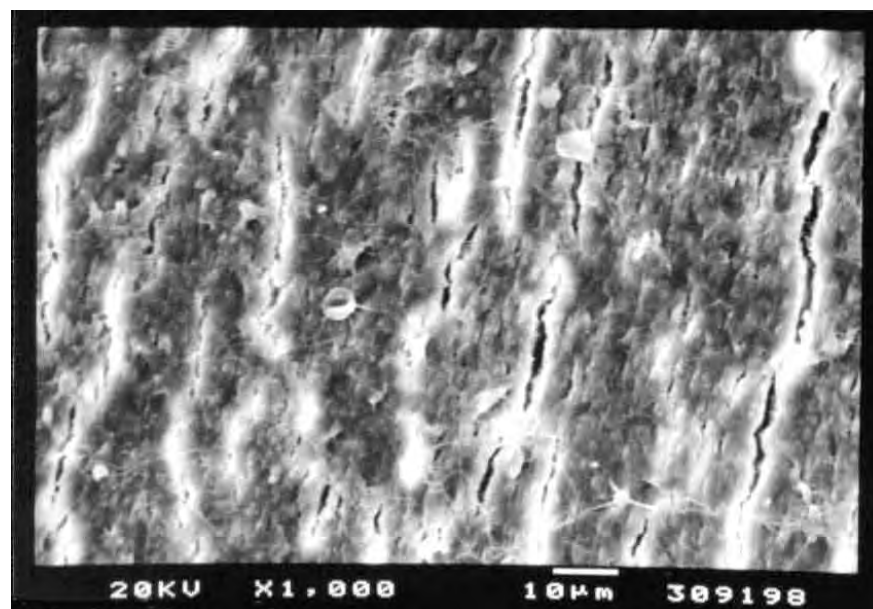


FIGURA 22 – Grupo V (citrato de sódio). Superfície radicular demonstrando ausência de rede de fibrina e de células sangüíneas (IAES 0). Aumento original 1000X.

Análise Estatística

Inicialmente foi realizada a avaliação da concordância intra-examinador, tanto para o índice de adesão de elementos sangüíneos quanto para o índice de biomodificação radicular. Para este fim, foi realizado o teste Kappa entre os 3 exames de cada índice (Tabela 2).

Tabela 2 – Síntese da comparação entre as leituras realizadas para cada índice, por meio do teste Kappa, de acordo com a classificação de Fleiss (1981)

Índice	Leituras comparadas	Valor de Kappa	Grau de concordância
IAES	1 e 2	0.923	Excelente
	1 e 3	0.923	Excelente
	2 e 3	1.000	Perfeita
IBR	1 e 2	0.925	Excelente
	1 e 3	0.925	Excelente
	2 e 3	0.888	Excelente

Amostras não submetidas à deposição de tecido sangüíneo:

O emprego do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, para avaliação do efeito das diferentes substâncias no Índice de Biomodificação Radicular (IBR), mostrou haver diferença entre pelo

menos dois dos tratamentos propostos, resultando em um valor de $H=53.7800$, significativo porque a ele correspondeu um valor de $p<0.0001$. Dessa forma, a hipótese de que todos os tratamentos promoveriam o mesmo grau de remoção de *smear layer* foi rejeitada. Devido à indicação de diferença entre os grupos, procedeu-se a comparação entre grupos pelo teste de Mann-Whitney. Pôde-se constatar que todas as substâncias testadas promoveram maior remoção de *smear layer* do que o grupo controle (I) ($p<0.0001$), além disso, a aplicação de ácido cítrico (III) foi mais efetiva na remoção desta camada e na exposição de fibras colágenas do que o cloridrato de tetraciclina (IV) ($p=0.0051$) e o citrato de sódio (V) ($p=0.0051$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores do teste de Kruskal-Wallis (H), número de amostras (N), postos médios (R) e o valor de p da comparação entre grupos da análise da morfologia da superfície radicular pelo teste de Mann-Whitney

Grupos	N	R H=53.7800	Valor de p
I - Controle	15	65.4667	I e II p<0.0001 I e III p<0.0001 I e IV p<0.0001 I e V p<0.0001
II - EDTA	15	29.0000	II e III p=0.1198 II e IV p=0.2134 II e V p=0.2134
III - Ácido cítrico	15	19.0000	III e IV p=0.0051 III e V p=0.0051
IV - Tetraciclina	15	37.0000	IV e V p=1.0000
V - Citrato de sódio	15	37.0000	-

Amostras submetidas à deposição de tecido sangüíneo:

Ao analisar a hipótese relativa aos efeitos dos tratamentos realizados sobre o Índice de Adesão de Elementos Sangüíneos, o teste estatístico de Kruskal-Wallis resultou em um valor de H=25.8200, o qual foi significativo, pois correspondeu a um valor de p<0.0001. Desta forma, a hipótese de nulidade pela qual todos os tratamentos realizados resultariam na mesma capacidade de adsorção e adesão de elementos

sangüíneos sobre a superfície foi rejeitada. Procedendo a comparação entre os grupos com a finalidade de detectar entre quais tratamentos houve diferença, o teste de Mann-Whitney resultou em diferenças estatísticas entre os grupos I e II ($p=0.0294$), I e III ($p=0.0002$), II e III ($p=0.0121$), III e IV ($p=0.0007$) e III e V ($p=0.0003$) (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores do teste de Kruskal-Wallis (H), número de amostras (N), postos médios (R) e o valor de p da comparação entre grupos da adesão de elementos sangüíneos pelo teste de Mann-Whitney

Grupos	N	R H=25.8200	Valor de p
I - Controle	15	26.1000	I e II $p=0.0294$ I e III $p=0.0002$ I e IV $p=0.1914$ I e V $p=0.8846$
II - EDTA	15	42.8000	II e III $p=0.0121$ II e IV $p=0.1711$ II e V $p=0.0512$
III - Ácido cítrico	15	59.3667	III e IV $p=0.0007$ III e V $p=0.0003$
IV - Tetraciclina	15	34.2000	IV e V $p=0.2808$
V - Citrato de sódio	15	27.5333	-

É importante salientar que em relação à adesão de elementos sangüíneos, que tanto a aplicação do gel de EDTA a 24% (II) quanto da solução de ácido cítrico a 25% (III) promoveram maior adesão de células sangüíneas e rede de fibrina mais estável ($p=0.0294$ e $p=0.0002$, respectivamente) do que o grupo controle. Além disso, o ácido cítrico mostrou-se mais efetivo do que o EDTA (II) ($p=0.0121$), o cloridrato de tetraciclina (IV) ($p=0.0007$) e o citrato de sódio (V) ($p=0.0003$) na adesão de elementos sangüíneos.

Relação exposição de fibras colágenas e adesão de elementos sangüíneos:

Para avaliação entre a possível relação entre a exposição de fibras colágenas e adesão de elementos sangüíneos, foram utilizados os dados da Tabela 5. O teste Qui-quadrado apresentou resultado estatisticamente significativo (Qui-quadrado=18.6100; $p<0.0001$), sugerindo que a exposição da matriz colágena dental pela biomodificação radicular eleva a quantidade de células sangüíneas e a estabilidade da rede de fibrina aderida à superfície dental.

Tabela 5 – Número de amostras que apresentavam o índice de biomodificação radicular dicotomizado 0 e 1 em cada índice para análise da adesão de elementos sangüíneos.

Morfologia	Índice de Adesão de Elementos Sangüíneos			
	0	1	2	3
0 (sem fibras)	23	25	12	2
1 (com fibras)	2	0	6	5

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

O principal objetivo da terapia periodontal regenerativa é obter inserção de novo tecido conjuntivo às superfícies radiculares previamente expostas a cavidade bucal ou ao ambiente subgengival dentro de bolsas periodontais. Na literatura ainda há grande discussão a respeito da necessidade da remoção completa de *smear layer* e exposição de fibras colágenas para se obter nova inserção de tecidos periodontais.

Alguns estudos mostraram que a ligação da rede de fibrina ao colágeno da superfície dental é necessária para resultados satisfatórios da cirurgia plástica periodontal (POLSON et al., 1983, 1984). Segundo estes autores, a análise dos eventos iniciais da formação do coágulo, sobre raízes desmineralizadas com ácido cítrico, sugeriu que a trombogenicidade da superfície é importante na adsorção dos elementos sangüíneos. Além disso, sugere-se que a exposição de fibras colágenas, pode melhorar o grau de organização do coágulo e retardar a formação de um epitélio juncional longo, promovendo ganho de inserção clínica (LARJAVA et al., 1988; STEINBERG et al., 1988).

De acordo com Shuman (2000) a exposição de fibras colágenas favorece duas etapas da formação do coágulo: a primeira é a atuação na ativação da cascata de coagulação que dá origem a rede de fibrina e a segunda é a indução da adesão, agregação e degranulação

plaquetária, resultando na formação e maturação do trombo. Inicialmente ocorre a deposição de uma camada protéica, seguida pela formação e estabilização da rede de fibrina devido à estimulação da degranulação plaquetária. A morfologia e o grau de maturação dessa rede resultam na quantidade de eritrócitos aderidos à superfície. É importante ressaltar que a ativação das plaquetas leva não só a formação do trombo, mas também, a liberação de moléculas biologicamente ativas que influenciam no processo de reparo tecidual (HUDSON-GOODMAN et al., 1990).

Muitos pesquisadores já se propuseram a estudar a formação do coágulo sobre a superfície radicular, desde seus eventos iniciais até a maturação completa, porém poucos trabalhos apresentaram metodologia adequada para analisar a adsorção dos elementos sangüíneos (POLSON e PROYE, 1983; WIKESJO e NILVÉUS, 1990; WIKESJO et al., 1991).

Como citado anteriormente, a metodologia deste estudo baseia-se no trabalho de Baker et al. (2000), no qual os autores pretendiam avaliar in vitro, a capacidade de sua metodologia em diferenciar o potencial de adsorção e adesão dos elementos sangüíneos à superfície radicular. Porém, a análise realizada foi apenas qualitativa, detendo-se na descrição dos achados microscópicos.

Em 2003, Theodoro propôs a avaliação das fotomicrografias por meio de escores tanto para a superfície radicular, que no presente estudo corresponde ao índice de biomodificação radicular (IBR), quanto

para os elementos sangüíneos, por meio do índice de adesão de elementos sangüíneos (IAES), na tentativa de obter dados quantitativos que permitissem a comparação entre grupos. Um diferencial desta dissertação foi a análise de toda a superfície radicular para obtenção de uma fotomicrografia que representasse a amostra, ao invés de pré-estabelecer a área a ser fotografada, além disso, a aplicação de um agente (HMDS) que permitisse visualizar a real ocorrência da biomodificação radicular pela exposição das fibras colágenas.

Vale ressaltar que cada substância foi aplicada de acordo com a metodologia recomendada pela literatura, com a finalidade de tentar obter remoção de *smear layer* e exposição de fibras colágenas, resultado este obtido em todos os trabalhos de onde os modos de aplicação foram retirados. Dessa forma, o EDTA e o citrato de sódio foram aplicados na forma de pincelamento sobre a superfície, pois sua agitação tende a diminuir a tensão superficial, aumentando o contato com a raiz e a efetividade. Já o ácido cítrico e a tetraciclina foram aplicados por meio de bolas de algodão, sendo que o primeiro entrou em contato com a superfície topicamente e a segunda solução foi friccionada. Para todos os agentes químicos, o tempo de 3 minutos foi citado como o mais efetivo para a exposição da matriz colágena.

De acordo com Wikesjö et al. (1992) e Polson e Proye (1983), as forças mecânicas incidentes no tecido gengival poderiam afetar a adesão do coágulo sobre a superfície radicular. Assim, o

condicionamento radicular seria indicado no aumento da resistência às forças tensionais, provavelmente pelo imbricamento mecânico entre fibrina e fibras colágenas. Além disso, como descrito por Ririe et al. em 1980, a desmineralização da superfície radicular leva a uma provável interdigitação entre as fibras colágenas dentais e as fibrilas colágenas do tecido conjuntivo.

Um fato importante a ser esclarecido é a opção pela não remoção completa do cimento, por meio de fresas em alta rotação ou qualquer outro mecanismo, como observado em alguns estudos descritos na literatura. Coldiron et al. (1990) mostraram que mesmo após realizar 70 movimentos de raspagem no mesmo local, microscopicamente ainda era possível observar ilhotas de cimento em meio à dentina. Dessa forma, buscou-se aproximar a metodologia o máximo possível dos procedimentos clínicos, onde em geral, a raspagem da superfície é realizada por meio de instrumentos manuais e não há garantia da remoção de toda a camada de cimento. Além disso, Zaman et al. (2000) e Cogen et al. (1984) demonstraram que não há diferenças na adesão de fibroblastos gengivais à superfície radicular com cimento ou dentina exposta, e que a aplicação de ácido cítrico e EDTA aumentaram o número dessas células aderidas em relação ao grupo apenas raspado.

Daly (1982) demonstrou que a aplicação de agentes químicos, como o ácido cítrico, na superfície dental é importante na redução do número de bactérias aeróbias e anaeróbias viáveis, aderidas

às estruturas periodontais. Aleo et al. (1974) verificaram que alguns produtos bacterianos eram capazes de permear pela camada de cimento e se alojar na junção cimento-dentinária. Por outro lado, Nakib et al. (1982) e Smart et al. (1990) citam fraca adesão desses metabólitos à superfície do cimento, fazendo com que sejam facilmente removidos, como demonstrado por Wirthlin et al. (1981), Nyman et al. (1988) e Blomlöf et al. (1989). Outro motivo para a não remoção completa deste tecido é que o cimento é fonte de fatores de crescimento, os quais podem auxiliar no reparo do periodonto após cirurgias e de acordo com McIntyre et al. (2000), serve de proteção contra agentes desmineralizantes que podem atuar gerando cáries radiculares.

Neste experimento, o ácido cítrico promoveu a melhor superfície para adsorção dos elementos sangüíneos, mostrando coágulos melhor organizados, resultado que corrobora com o encontrado por Baker et al. (2005). Sugere-se que esse fato seja decorrente da maior exposição de fibras colágenas neste grupo e por seu modo de ação, uma vez que agindo como agente desmineralizador tende a ser mais fácil sua remoção por irrigação, quando comparado a uma substância quelante, a qual se liga a superfície para remover o íon cálcio.

Tanto o EDTA quanto o citrato de sódio são agentes quelantes de cálcio, os quais podem remover íons cálcio que são essenciais durante a ativação da cascata da coagulação, levando a um retardo na formação do coágulo. É provável que resíduos desses agentes

possam ter ficado ligados a superfície radicular, levando ao retardo na formação da rede de fibrina quando comparado ao grupo onde foi utilizado o ácido cítrico, mesmo havendo fibras colágenas expostas no grupo do EDTA. Uma outra explicação sugerida por Lasho et al. (1983), é a de que aparentemente, o gel de EDTA causa alterações na morfologia da matriz colágena dental, alterando sua conformação. Apesar disso, o gel de EDTA mostrou melhores resultados que o citrato de sódio e a tetraciclina.

O colágeno e a trombina presentes na lesão são os principais responsáveis pela aderência plaquetária e pela coesão das mesmas, ou seja, agregação entre si. Segundo Rapaport (1987), a formação da rede de fibrina ocorre devido à ativação e degranulação plaquetária. A ligação entre colágeno e fibrina é mediada por uma proteína plasmática denominada fibronectina, a qual depende do fator XIII da coagulação para estabelecer esta união (POLSON e PROYE, 1983). Ainda de acordo com estes autores, a fibronectina não é um fator crítico para o sucesso de um procedimento periodontal visando à inserção conjuntiva, mas desempenha papel de grande importância neste processo.

Inicialmente, após a ativação das plaquetas, os grânulos alfa, contidos no interior destas células, são liberados formando fibrinogênio, o qual é convertido em fibrina (GANONG, 2005). À medida que é formada, a rede de fibrina é convertida de malha frouxa de fios

entrelaçados em um agregado denso, cuja coesão é realizada por ligações cruzadas covalentes catalisadas pelo fator XIII ativo, o qual necessita de íons cálcio para seu funcionamento (GANONG, 2005).

Dessa forma, por ter comportamento químico quelante de cálcio, que pode levar a inibição da formação e aderência do coágulo à superfície dental, no nosso ponto de vista, isso pode explicar os resultados pouco satisfatórios do emprego do gel de EDTA na maioria dos trabalhos clínicos envolvendo a terapia periodontal (BLOMLÖF et al., 2000; MAYFIELD et al., 1998).

Estudos in vivo utilizando o ácido cítrico em animais e humanos, mostraram nova inserção do tecido conjuntivo e cementogênese (CAFFESSE et al., 1985; LÓPEZ, 1984), porém outros não observaram diferenças na inserção conjuntiva e nos parâmetros clínicos periodontais, como profundidade de sondagem e nível de inserção (SMITH et al., 1987; KERSTEN et al., 1992). Por outro lado, a literatura concorda que há remoção de *smear layer* e exposição das fibras colágenas (KASSAB e COHEN, 2003).

Pertencente também ao grupo dos agentes de baixo pH, a tetraciclina é um antibiótico cujo uso foi iniciado na Periodontia, em pacientes com prognóstico desfavorável pelo grau avançado da doença, sendo utilizadas sistêmica ou localmente (LISTGARTEN et al., 1978). Os estudos mostraram que o cloridrato de tetraciclina, devido ao seu pH baixo e por sua capacidade de quelar íons cálcio, era capaz de

desmineralizar a superfície radicular. Além disso, alguns trabalhos sugeriram que a tetraciclina é capaz de inibir a produção de collagenase e, conseqüentemente, a reabsorção óssea, e é capaz de ser adsorvida à superfície radicular, sendo liberada lentamente por até 14 dias (GOLUB et al. 1994, GOMES et al. 1994). Tanto seu emprego quanto o de ácido cítrico foi questionado por terem sido relatados casos de necrose dos tecidos periodontais adjacentes ao sítio cirúrgico, o que levaria a diminuição do aporte sangüíneo e celular durante o período de reparo.

Bal et al. (1990), avaliaram a formação do coágulo em raízes de dentes humanos afetados pela doença periodontal. Após raspagem o condicionamento foi realizado com solução de ácido cítrico 1% ou solução de cloridrato de tetraciclina 50 mg/mL. Aos 3 minutos, as raízes tratadas com tetraciclina apresentaram coágulo em estágio de formação mais avançado em relação ao grupo tratado com ácido cítrico. Este resultado difere do encontrado neste estudo, onde após 20 minutos de formação do coágulo, a superfície condicionada pelo ácido cítrico mostrou-se mais favorável à adesão e organização do coágulo em relação à tratada com tetraciclina. De acordo com o teste de coagulação pelo método de Lee and White (HOUGIE, 1961), a maturação de um coágulo in vitro a 37°C, leva entre 4 e 10 minutos para ser considerada completa, portanto, é provável que após os 3 minutos estipulados por Bal e seus colaboradores, para comparar os coágulos obtidos, os mesmos ainda não estivessem completamente estabelecidos.

Em 1999, Delazari et al. não encontraram diferenças na quantidade e distribuição dos elementos sangüíneos entre os dentes com superfície apenas raspada e aqueles que, após raspagem, receberam condicionamento com cloridrato de tetraciclina, semelhante aos resultados deste estudo.

Zaman et al. (2000) verificaram que a inserção das fibras do ligamento periodontal em superfícies tratadas com ácido cítrico, EDTA e tetraciclina, apresentou o mesmo padrão de distribuição que o encontrado para os elementos sangüíneos nesta avaliação. Assim, o ácido cítrico e o EDTA mostraram-se melhores que a tetraciclina, tanto na adesão quanto na orientação das células do ligamento. Além disso, não foram encontradas diferenças na inserção das células comparando, dentro da mesma substância, superfícies de dentina ou de cimento.

Vale ressaltar que o gel de EDTA foi proposto por ser uma substância quelante de cálcio, com pH neutro, o que teoricamente diminuiria seus efeitos nocivos se aplicado acidentalmente sobre os tecidos moles periodontais (BLOMLÖF et al., 1997). Alguns estudos mostraram que a adesão celular e o reparo tecidual são melhores utilizando o gel de EDTA se comparado aos agentes de baixo pH, obtendo 20% de ganho de inserção com o uso de EDTA e 10% utilizando ácido cítrico (BLOMLÖF e LINDSKOG, 1995a, 1995b; BLOMLÖF et al., 1996). Já Mayfield et al. (1998) e Blomlöf et al. (2000) não observaram diferenças nos parâmetros clínicos pós-cirúrgicos, comparando

superfícies apenas raspadas e raspadas seguidas pela aplicação do EDTA.

Diferente dos estudos de Theodoro (2003) e Leite et al. (2005), o grupo tratado com EDTA apresentou resultado estatisticamente superior ao grupo controle. No trabalho publicado em 2005, Leite et al. verificaram que algum componente presente no gel industrializado (no caso, EDTA PrefGel da marca Biora) ou o tempo de produção poderiam ter influenciado sua ação na adesão de elementos sangüíneos, visto que o gel manipulado (Farmácia Santa Paula, Araraquara-SP) no momento do uso, apresentou eficácia maior. Desta forma, parece-nos oportuno verificar o tempo de viabilidade e as alterações físico-químicas que podem ocorrer neste gel após seu preparo e armazenamento. Além da presença de algum componente químico nos EDTA industrializados que possam interferir no processo de formação do coágulo, provavelmente dificultando sua remoção da superfície radicular como proposto por Theodoro (2003).

Em estudos realizados nos anos de 2000 e 2005, Baker et al. verificaram que a aplicação de ácido cítrico promove maior adesão e estabilização dos elementos sangüíneos em relação à raspagem isoladamente e também à aplicação de EDTA, da mesma forma que foi verificada neste trabalho. Além disso, observaram que o ácido cítrico promoveu melhor limpeza dos detritos da superfície promovendo inserção direta da rede de fibrina à superfície dental, o que já não ocorreu nas superfícies tratadas com EDTA, nas quais o coágulo foi obtido em menor

quantidade e era facilmente destacado devido à fraca adesão à superfície.

A aplicação tanto de ácido cítrico quanto de EDTA parece ressaltar a relação entre causa e efeito entre exposição de fibras colágenas e adesão de elementos sangüíneos. Nestes grupos, onde foram observadas as maiores quantidades de amostras com fibras colágenas expostas, também foram obtidas as maiores quantidades de amostras com IAES 2 e 3, caracterizando moderada a alta quantidade de elementos aderidos.

Tendo em vista a complexidade do processo de reparo tecidual, o qual não se restringe apenas ao processo de adsorção e adesão do coágulo à superfície dental, há necessidade de se realizar estudos in vivo controlados, para avaliar se os resultados obtidos neste estudo são condizentes com os observados em tecidos periodontais sob função.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Considerando as limitações inerentes a metodologia empregada e seus resultados, pode-se concluir que:

- Todas as substâncias empregadas foram capazes de remover efetivamente *smear layer* quando comparadas ao grupo controle;
- Apenas o ácido cítrico e o gel de EDTA promoveram maior adesão de elementos sangüíneos à superfície radicular quando comparadas ao grupo controle;
- A aplicação da solução de ácido cítrico a 25% mostrou-se mais efetiva na adesão de elementos sangüíneos à superfície radicular quando comparada aos demais agentes químicos avaliados;
- A biomodificação radicular, consistindo na remoção de *smear layer* e exposição de fibras colágenas, sugere maior adesão de elementos sangüíneos à superfície radicular, provavelmente pela maior possibilidade de estabilização da rede de fibrina pela interação com a matriz colágena dental;
- Não apenas a remoção de *smear layer*, mas também a exposição de fibras colágenas é necessária para a adesão do coágulo à superfície dental.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

ABI RACHED, A.D. **Remoção de smear layer de superfícies radiculares utilizando diferentes concentrações, modos e tempos de aplicação de cloridrato de tetraciclina. Análise por meio de microscopia eletrônica de varredura.** 2003. 184 f. Dissertação (Mestrado em Periodontia) - Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.

ADRIAENS, P.A.; EDWARDS, C.A.; DE BOUER, J.A.; LOESCHE, W.J. Ultrastructural observation on bacterial invasion in cementum and radicular dentin of periodontally diseased human teeth. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 54, n.8, p. 493-503, Aug. 1988.

ALEO, J.J.; DE RENZIS, F.A.; FABER, P.A.; VARBONCOEUR, A.P. The presence and biologic activity of cementum bound endotoxin. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 45, n.11, p. 672-675, Sept. 1974.

ATILLA, G.; BAYLAS, H. Effect of various demineralizing agents on mineral contents of cementum surfaces. **J. Marmara Univ. Dent. Fac.**, Istanbul, v. 2, n. 2, p. 515-519, Sept. 1996.

BABAY, N. The effect of tetracycline hydrochloride on the attachment of gingival fibroblasts. A scanning electron microscopic study on the effect of

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

ultrasonic scaling before root conditioning. **Odontostomatol. Trop.**, Dakar, v. 25, n. 100, p. 13-17, Dec. 2002.

BABAY, N. Nondiseased dentinal root surface following citric acid or tetracycline hydrochloride conditioning: a scanning electron microscopic study on the effects of ultrasonic irrigation before and after root conditioning. **Quintessence Int.**, Berlin, v. 28, n. 2, p. 93-97, Feb. 1997.

BABAY, N. SEM study on the effect of two different demineralization methods with saturated tetracycline hydrochloride on diseased root surfaces. **J. Contemp. Dent. Pract.**, Cincinnati, v. 15, n. 2, p. 25-35, May 2001.

BAKER, D.L.; STANLEY PAVLOW, S.A.; WIKESJÖ, U.M. Fibrin clot adhesion to dentin conditioned with protein constructs: an in vitro proof-of-principle study. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 32, n. 6, p. 561-566, June 2005.

BAKER, P.J.; ROTCH, H.A.; TROMBELLI, L.; WIKESJÖ, U.M.E. An in vitro screening model to evaluate root conditioning protocols for periodontal regenerative procedures. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 71, n. 7, p. 1139-1143, July 2000.

BAL, B.; EREN, K.; BALOS, K. Effects of various root surface treatments on initial clot formation: a scanning electron microscope study. **J. Nihon Univ. Sch. Dent.**, Tokyo, v. 32, n. 4, p. 281-293, Dec. 1990.

BATISTA, L.H.C. **Estudo *in vitro* da eficácia de um gel de EDTA-T na remoção da "smear layer" da superfície radicular.** 2002. 62 f.

Dissertação (Mestrado em Periodontia) - Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

BEN-YEHOUDA, A. Progressive Cervical root resorption related to tetracycline root conditioning. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 68, n. 5, p. 432-435, May 1997.

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. Periodontics Restorative Dent.**, Chicago, v. 18, n. 2, p. 171-179, Apr. 1998.

BERGSTRÖM, J. Tobacco smoking and subgingival dental calculus. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 32, n. 1, p. 81-88, Jan. 2005.

BLOMLÖF, J.; LINDSKOG, S. Periodontal tissue-vitality after different etching modalities. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 22, p. 464-468, June 1995a.

BLOMLÖF, J.; LINDSKOG, S. Root surface texture and early cell and tissue colonization after different etching modalities. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v. 103, n. 9, p. 17-24, Feb. 1995b.

BLOMLÖF, P.S.; BLOMLÖF, B.; LINDSKOG, S. Smear removal and collagen exposure after non-surgical root planing followed by etching with an EDTA gel preparation. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 67, n. 2, p. 841-845, Sept. 1996.

BLOMLÖF, P.S.; BLOMLÖF, B.; LINDSKOG, S. Effect of different concentrations of EDTA on smear removal and collagen exposure in periodontitis-affected root surfaces. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 24, n. 8, p. 534-537, Aug. 1997.

BLOMLÖF, L.; JONSSON, B.; BLOMLÖF, J.; LINDSKOG, S. A clinical study of root surface conditioning with an EDTA gel. II. Surgical periodontal treatment. **Int. J. Periodontics Restorative Dent.**, Chicago, v. 20, n. 6, p. 566-573, Dec. 2000.

BLOMLÖF, L.; FRISKOPP, J.; APPELGREN, R.; LINDSKOG, S.; HAMMARSTROM, L. Influence of granulation tissue, dental calculus and contaminated root cementum on periodontal wound healing. An experimental study in monkeys. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 16, n. 1, p. 27-32, Jan. 1989.

CAFFESSE, R.G.; HOLDEN, M.J.; KON, S.; NASJLETI, C.E. The effect of citric acid and fibronectin application on healing following surgical treatment of naturally occurring periodontal disease in beagle dogs. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.12, n. 7, p. 578-590, Aug. 1985.

CATON, J.G.; GREENSTEIN, G. Factors related to periodontal regeneration. **Periodontol. 2000**, Copenhagen, v. 1, n. 1, p. 9-15, Feb. 1993.

CHRISTERSSON, L.A.; NORDERYD, O.M.; PUCHALSKY, C.S. Topical application of tetracycline-HCl in human periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 20, n. 2, p. 88-95, Feb. 1993.

CLAFFEY, N.; BOGLE, G.; BJORVATN, K.; SELVIG, K.A.; EGELBERG, J. Topical application of tetracycline in regenerative periodontal surgery in beagles. **Acta Odontol. Scand.**, Stockholm, v. 45, n. 3, p. 141-146, June 1987.

COGEN, R.B.; AL-JOBURI, W.; GANTT, D.G.; DENYS, F.R. Effect of various root surface treatments on the attachment and growth of human gingival fibroblasts: histologic and scanning electron microscopic evaluation. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 11, n. 8, p. 531-539, Sept. 1984.

COLDIRON, N.B.; YUKNA, R.A.; WEIR, J.; CAUDILL, R.F. A quantitative study of cementum removal with hand curettes. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 61, n. 5, p. 293-299, May 1990.

COLE, R.; NILVEUS, R.; AINAMO, J.; BOGLE, G.; CRIGGER, M.; EGELBERG, J. Pilot clinical studies on the effect of topical citric acid application on healing after replaced periodontal flap surgery. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 16, n. 1, p. 117-122, Jan. 1981.

CUFF, M.J.; MCQUADE, M.J.; SCHEIDT, M.J.; SUTHERLAND, D.E.; VAN DYKE, T.E. The presence of nicotine on root surfaces of periodontally diseased teeth in smokers. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 60, n. 10, p. 564-569, Oct. 1989.

DALY, C.G. Anti-bacterial effect of citric acid treatment of periodontally diseased root surfaces in vitro. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 9, n.5, p. 386-92, Sept. 1982.

DELAZARI, F.M.; GERLACH, R.F.; JOLY, J.C.; DE LIMA A.F. Scanning electron microscopy study of the effect of tetracycline HCl on smear layer removal and fibrin network formation. **Braz. Dental J.**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 2, p. 81-87, May/Aug. 1999.

DEWAN, D.M.; WRITER, W.D.; WHEELER, A.S.; JAMES, F.M.^{3RD}; FLOYD, H.M.; BOGARD, T.D.; RHYNE, L. Sodium citrate premedication in elective caesarean section patients. **Can. Anaesth. Soc. J.**, Toronto, v. 29, n. 4, p. 355-358, July 1982.

DREYER, W.P.; MARESKY, L.S.; DIAMOND, A. The healing of citric acid treated root surfaces in the baboon (*Papio ursinus*): a morphological study. **J. Dent. Assoc. S. Afr.**, Cape Town, v. 39, n. 10, p. 663-669, Oct. 1984.

DYER, B.L.; CAFFESSE, R.G.; NASJLETI, C.E.; MORRISON, E.C. Guided tissue regeneration with dentin biomodification. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 64, n. 11, p. 1052-1060, Nov. 1993.

FLEISS, J.L. **Statistical methods for rates and proportions**. 2 ed. New York:Wiley, 1981. p. 217-219.

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

FUENTES, P.; GARRETT, S.; NILVEUS, R.; EGELBERG, J. Treatment of periodontal furcation defects. Coronally positioned flap with or without citric acid root conditioning in class II defects. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 20, n. 6, p. 425-430, July 1993.

FUKUDA, A.; ISHIDA, H.; KUBOTA, M.; KOJIMA, Y.; MIZOBATA, Y.; MATSUOKA, T.; YOKOTA, J. Clinical data obtained through coagulation testing suggests that hypothermia exerts influence on a patient's blood coagulation reaction. **Rinsho Byori**, Tokyo, v. 48, n. 12, p. 1102-1108, Dec. 2000.

GAMAL, A.Y.; MAILHOT, J.M. The effects of EDTA gel conditioning exposure time on periodontitis-affected human root surfaces: surface topography and PDL cell adhesion. **J. Int. Acad. Periodontol.**, London, v. 5, n. 1, p. 11-22, Jan. 2003.

GANONG, W. **Review of medical physiology**. 22. ed. New York: McGraw-Hill, 2005. 928p.

GARRETT, J.S.; CRIGGER, M.; EGELBERG J. Effects of citric acid on diseased root surfaces. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 13, n. 2, p. 155-163, Mar. 1978.

GOLUB, L.M.; WOLFF, M.; ROBERTS, S.; LEE, H.M.; LEUNG, M.; PAYONK, G.S. Treating periodontal diseases by blocking tissue-destructive enzymes. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 125, n. 2, p. 163-169, Feb. 1994.

GOMES, B.C.; GOLUB, L.M.; RAMAMURTHY, N.S. Tetracycline inhibit parathyroid hormone induced bone resorption in organ culture. **Experientia**, Basel, v. 40, n. 11 p. 1273-1275, Nov. 1984.

HANDELSMAN, M.; DAVARPANAH, M.; CELLETTI, R. Guided tissue regeneration with or without citric acid treatment in vertical osseous defects. **Int. J. Periodontics Restorative Dent.**, Chicago, v. 11, n. 5, p. 350-363, Sept./Oct. 1991.

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

HANES, P.J.; POLSON, A.M.; LADENHEIM, S. Cell and fiber attachment to demineralized dentin from normal root surfaces. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 56, n. 12, p. 752-756, Dec. 1985.

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

HIATT, W.H.; STALLARD, R.E.; BUTLER, E.D.; BADGETT, B. Repair following mucoperiosteal flap surgery with full gingival retention. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 39, n. 1, p. 11-16, Jan. 1968.

HOUGIE, C. The Lee and White test for coagulation time. **Am. J. Clin. Pathol.**, Chicago, v. 36, n. 12, p. 537-538, Dec. 1961.

HUDSON-GOODMAN, P.; GIRARD, N.; JONES, M.B. Wound repair and the potential use of growth factors. **Heart Lung**, St. Louis, v. 19, n. 4, p. 379-384, July 1990.

ISIK, G.; INCE, S.; SAGLAM, F.; ONAN, U. Comparative SEM study on the effect of different demineralization methods with tetracycline HCl on healthy root surfaces. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 24, n. 9, p. 589-94, Sept. 1997.

ISIK, A.G.; TARIM, B.; HAFEZ, A.A.; YALCIN, F.S.; ONAN, U.; COX, C.F.A. comparative scanning electron microscopic study characteristics or demineralized dentin root surface using different tetracycline HCL concentrations and applications times. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 71, n. 2, p. 219-225, Feb. 2000.

JENNY, R.J.; MANN, K.G. Factor V: a prototype pro-cofactor for vitamin K-dependent enzyme complexes in blood clotting. **Baillieres Clin. Haematol.**, London, v. 2, n. 4, p. 919- 944, Oct. 1989.

JEONG, S.N.; HAN, S.B.; LEE, S.W.; MAGNUSSON, I. Effects of tetracycline - Containing gel and a mixture of tetracycline and citric acid. - Containing gel on non-surgical periodontal therapy. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 65, n. 9, p. 840-847, Sept. 1994.

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.**, Chicago, v. 49, n. 7, p. 337-342, July 1978.

KASSAB, M.; COHEN, R.E. The effect of root modification and biomodification on periodontal therapy. **Compend. Contin. Educ. Dent.**, Lawrenceville, v. 24, n. 1, p. 31-34, Jan. 2003.

KERSTEN, B.G.; CHAMBERLAIN, A.D.; KHORSANDI, S.; WIKESJÖ, U.M.; SELVIG, K.A.; NILVEUS, R.E. Healing of the intrabony periodontal lesion following root conditioning with citric acid and wound closure including an expanded PTFE membrane. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 63, n. 11, p. 876-882, Nov. 1992.

LABAHN, R.; FAHRENBACH, W. H.; CLARK, S. M.; LIE, T.; ADAMS, D. F. Root dentin morphology after different modes of citric acid and tetracycline hydrochloride conditioning. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 63, n. 4, p. 303-309, Apr. 1992.

LAFFERTY, T.A.; GHER, M.E.; GRAY, J.L. Comparative SEM study on the effect of acid etching with tetracycline HCL or citric acid on instrumented periodontally-involved human root surfaces. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 64, n. 8, p. 689-693, Aug. 1993.

LAN, W.C.; LAN, W.H.; CHAN, C.P.; HSIEH, C.C.; CHANG, M.C.; JENG, J.H. The effects of extracellular citric acid acidosis on the viability, cellular adhesion capacity and protein synthesis of cultured human gingival fibroblasts. **Aust. Dental J.**, Sydney, v. 44, n. 2, p. 123-130, June 1999.

LARJAVA, H.; SALONEN, J.; HAKKINEN, L.; NARHI, T. Effect of citric acid treatment on the migration of epithelium on root surfaces in vitro. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 59, n. 2, p. 95-99, Feb. 1988.

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.**, Chicago, v. 54, n. 4, p. 210-220, Apr. 1983.

LEITE, F.R.M.; MOREIRA, C.S.; THEODORO, L.H.; SAMPAIO, J.E.C. Blood cell attachment to root surfaces treated with EDTA gel. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 88-92, Abr./Jun. 2005.

LISTGARTEN, M.A.; LINDHE, J.; HELLDEN, L. Effect of tetracycline and/or scaling on human periodontal disease. Clinical, microbiological, and histological observations. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 5, n. 4, p. 246-271, Nov. 1978.

LOPEZ, N.J. Connective tissue regeneration to periodontally diseased roots, planed and conditioned with citric acid and implanted into the oral mucosa. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 55, n. 7, p. 381-390, July 1984.

MAYFIELD, L.; SÖDERHOLM, G.; NORDERYD, O.; ATTSTROM, R. Root conditioning using EDTA gel as an adjunct to surgical therapy for the treatment of intraosseous periodontal defects. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 25, n. 9, p. 707-714, Sept. 1998.

McCLAIN, P.K.; SCHALLHORN, R.G. Long-term assessment of combined osseous composite grafting, root conditioning, and guided tissue regeneration. **Int. J. Periodontics Restorative Dent.**, Chicago, v. 13, n. 1, p. 9-27, Jan./Feb. 1993.

McINTYRE, J.M.; FEATHERSTONE, J.D.; FU, J. Studies of dental root surface caries. 2: The role of cementum in root surface caries. **Aust. Dent. J.**, Sydney, v. 45, n. 2, p. 97-102, June 2000.

MENDES, M.M.S.G.; ZENÓBIO, E.G.; EL-GUINDY, M.M.; TOLEDO, B.E.C. Condicionamento radicular com ácido cítrico. **Rev. Abo Nac.**, Rio de Janeiro, v. 6, n. 1, p. 24-28, Jan./Fev. 1998.

NAKIB, N.M.; BISSADA, N.F.; SIMMELINK, J.W.; GOLDSTINE, S.N. Endotoxin penetration into root cementum of periodontally healthy and diseased human teeth. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 53, n. 6, p. 368-378, June 1982.

NISHIOKA, T.; YOKOTA, M.; TSUDA, I.; TATSUMI, N. Flow cytometric analysis of platelet activation under calcium ion-chelating conditions. **Clin. Lab. Haematol.**, Oxford, v. 24, n. 2, p. 115-119, Apr. 2002.

NUCKTON, T.J.; GOLDRICH, D.; ROGASKI, K.D.; LESSANI, T.M.; HIGGINS, P.J.; CLAMAN, D.M. Hypothermia from prolonged immersion: biophysical parameters of a survivor. **J. Emerg. Med.**, New York, v. 22, n. 4, p. 371-374, May 2002.

NYMAN, S.; WESTFELT, E.; SARHED, G.; KARRING, T. Role of "diseased" root cementum in healing following treatment of periodontal disease. A clinical study. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 15, n. 7, p. 464-468, Aug. 1988.

PARASHIS, A.O.; MITSIS, F.J. Clinical evaluation of the effect of tetracycline root preparation on guide tissue regeneration in the treatment of class II furcation defects. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 64, n. 2, p. 133-136, Feb. 1993.

PILATTI, G.L. **Estudo “in vitro” da eficácia de um gel de EDTA na remoção da "smear layer" da superfície radicular. Influência da concentração, tempo e forma de aplicação.** 2001. 141 f. Tese (Doutorado em Periodontia) - Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

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

POLSON, A.M.; FREDERICK, G.T.; LADENHEIM, S.; HANES, P.J. The production of a root surface smear layer by instrumentation and its removal by citric acid. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 55, n. 8, p. 443-446, Aug. 1984.

RAPAPORT, S. I. **Introduction to hematology.** 2nd. ed. Philadelphia: Lippincott Company, 1987. 624p.

REGISTER, A.A.; BURDICK, F.A. Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized in situ. I. Optimum range. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 46, n. 11, p. 646-655, Nov. 1975.

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

RENVERT, S.; EGELBERG, J. Healing after treatment of periodontal intraosseous defects. II. Effect of citric acid conditioning of the root surface. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 8, n. 6, p. 459-473, Dec. 1981

RIRIE, C.M.; CRIGGER, M.; SELVIG, K.A. Healing of periodontal connective tissues following surgical wounding and application of citric acid in dogs. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 314-27, May 1980.

SAMMONS, P.R.; WANG, H.L.; CHIEGO, D.J.; CASTELLI, W.A.; SMITH, B.A. Effect of root conditioning on periodontal wound healing with and without guided tissue regeneration: A pilot study II. **Int. J. Periodontics Restorative Dent.**, Chicago, v. 14, n. 1, p. 62-69, Feb. 1994.

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. 73 f. Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1999.

SHAPIRA, L.; HORI, Y.; RARAK, V.; HALABI, A.; SOSKOLNE, W.A.; STABHOLZ, A. Human monocyte response to cementum extracts from periodontally diseased teeth: effect of conditioning with tetracycline. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 67, n. 7, p. 686-687, July 1996.

SHUMAN, M. Hemorrhagic disorders: abnormalities of platelet and vascular function. In: GOLDMAN, L.; BENNETT, J. C. **Cecil textbook of medicine.** 20 ed. Philadelphia:Saunders, 2000. p. 23.

SMART, G.J.; WILSON, M.; DAVIES, E.H.; KIESER, J.B. The assessment of ultrasonic root surface debridement by determination of residual endotoxin levels. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 17, n. 3, p. 174-178, Mar. 1990.

SMITH, B.; CAFFESSE, R.; NASJLETI, C.; KON, S.; CASTELLI, W. Effects of citric acid and fibronectin and laminin application in treating periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 14, n. 7, p. 396-402, Oct. 1987.

SOUSA, C.P. **Estudo *in vitro* da eficácia do gel de EDTA 24% na remoção de “smear layer” e exposição de fibras colágenas da superfície radicular.** 2004. 116 f. Tese (Doutorado em Periodontia) - Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

STABHOLZ, A.; KETTERING, J.; APRECIO, R.; ZIMMERMAN, G.; BAKER, P.J.; WIKESJÖ, U.M. Retention of antimicrobial activity by human root surfaces after in situ subgingival irrigation with tetracycline HCl or chlorhexidine. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 64, n. 2, p. 137-141, Feb. 1993a.

STABHOLZ, A.; KETTERING, J.; APRECIO, R.; ZIMMERMAN, G.; BAKER, P.J.; WIKESJÖ, U.M. Antimicrobial properties of human dentin impregnated with tetracycline HCl or chlorhexidine. An in vitro study. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 20, n. 8, p. 557-562, Sept. 1993b.

STEINBERG, A.D.; WILLEY, R. Scanning electron microscopy observations of initial clot formation on treated tooth surfaces. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 59, n. 6, p. 403-411, June 1988.

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

STERRETT, J.D.; DHILLON, M.; MURPHY, H.J. Citric acid demineralization of cementum and dentin: the effect of application pressure. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 22, n. 6, p. 434-441, June 1995.

STERRETT, J.D.; SIMMONS, J.; WHITFORD, G.; RUSSELL, C.M. Tetracycline demineralization of dentin: the effects of concentration and application time. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 24, n. 7, p. 457-463, July 1997.

THEODORO, L.H. **Ação do laser de Er:YAG e de diodo na adesão de elementos sanguíneos e na morfologia de superfície radicular irradiadas. Estudo através de microscopia eletrônica de varredura.** 2003. 148 f. Tese (Doutorado em Periodontia) - Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.

TRIKILIS, N.; RAWLINSON, A.; WALSH, T.F. Periodontal probing depth and subgingival temperature in smokers and non-smokers. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 26, n. 1, p. 38-43, Jan. 1999.

TROMBELLI, L.; SCABBIA, A.; CALURA, G. Nondiseased cementum and dentin root surface following tetracycline HCl conditioning: sem study of the effects of solution concentration and application time. **Int. J. Periodontics Restorative Dent.**, Chicago, v. 14, n. 10, p. 461-470, Oct. 1994.

TROMBELLI, L.; SCABBIA, A.; ZANGARI, F.; GRISELLI, A. Effect of tetracycline HCl on periodontally-affected human root surfaces. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 66, n. 8, p. 685-691, Aug. 1995.

VAN WINKELHOFF, A.J.; BOSCH-TIJHOF, C.J.; WINKEL, E.G.; VAN DER REIJDEN, W.A. Smoking affects the subgingival microflora in periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 72, n. 5, p. 666-671, May 2001.

WANG, H.L.; DOCTOR, M.R.; CASTELLI, W.A.; CHIEGO, D.J.; SMITH, B.A. Effect of root conditioning on periodontal microvascular wound healing with and without guided tissue membrane: A pilot study. **Periodontal Clin. Investig.**, Port Washington, v. 15, n. 2, p. 19-27, Fall 1993.

WEYLAND, W.; FRITZ, U.; FABIAN, S.; JAEGER, H.; CROZIER, T.; KIETZMANN, D.; BRAUN, U. Postoperative warming therapy in the recovery room. A comparison of radiative and convective warmers. **Anaesthesist**, Berlin, v. 43, n. 10, p. 648-657, Oct. 1994.

WIKESJÖ, U.M.; NILVEUS, R.E. Periodontal repair in dogs: effect of wound stabilization on healing. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 61, n. 12, p. 719-724, Dec. 1990.

WIKESJÖ, U.M.; CLAFFEY, N.; EGELBERG, J. Periodontal repair in dogs. Effect of heparin treatment of the root surface. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 18, n. 1, p. 60-64, Jan. 1991.

WIKESJÖ, U.M.; NILVEUS, R.E.; SELVIG, K.A. Significance of early healing events on periodontal repair: a review. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 63, n. 3, p. 158-165, Mar. 1992.

WIRTHLIN, M.R.; HANCOCK, E.B.; GAUGLER, R.W. Regeneration and repair after biologic treatment of root surfaces in monkeys. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 52, n. 12, p. 729-735, Dec. 1981.

YEUNG, S.; CLARKE, N. Pulpal effect of citric acid applied topically to root surfaces. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 56, n. 3, p. 317-320, Sept. 1983.

ZAMAN, K.U.; SUGAYA, T.; HONGO, O.; KATO, H. 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.**, Chicago, v. 71, n. 7, p.1094-1099, July 2000.

ZUABI, O.; MACHTEI, E.E.; BEN-ARYEH, H.; ARDEKIAN, L.; PELED, M.; LAUFER, D. The effect of smoking and periodontal treatment on salivary composition in patients with established periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 70, n. 10, p. 1240-1246, Oct. 1999.

RESUMO

LEITE, F.R.M. **Efeito do condicionamento radicular com ácido cítrico, citrato de sódio, EDTA e tetraciclina na adesão de elementos sangüíneos. Estudo por meio de microscopia eletrônica de varredura.** 2006. 138 f. Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

RESUMO

A raspagem gera *smear layer* que contém microrganismos e toxinas, podendo interferir no reparo periodontal. Por esse motivo, diferentes substâncias têm sido empregadas para remover esta camada e expor fibras colágenas da superfície dental. A adesão de elementos sangüíneos a superfícies radiculares desmineralizadas e a estabilização do colágeno pelas fibras colágenas são de extrema importância no sucesso da cirurgia periodontal. O objetivo deste estudo foi avaliar os diferentes padrões de adsorção e adesão de elementos sangüíneos a superfícies radiculares quimicamente condicionadas. Setenta e cinco dentes foram raspados, eqüitativamente divididos em 5 grupos: irrigação com água destilada (controle), aplicação de solução de ácido cítrico a 25%, solução de citrato de sódio a 30%, gel de EDTA a 24% e solução de cloridrato de tetraciclina a 50 mg/mL. Metade da superfície condicionada foi exposta a sangue fresco e

preparada para microscopia eletrônica de varredura. As superfícies radiculares raspadas e condicionadas com EDTA e ácido cítrico apresentaram os melhores resultados em relação ao grupo controle. O ácido cítrico também se mostrou mais efetivo na remoção de *smear layer* e na adesão de elementos sangüíneos do que o cloridrato de tetraciclina e o citrato de sódio. Além disso, a relação entre exposição de fibras colágenas e adesão de elementos sangüíneos foi positiva. Dessa forma, o emprego de EDTA e ácido cítrico sobre a superfície radicular aumentam a adsorção e adesão de células sangüíneas e a estabilização da rede de fibrina.

Palavras-chave: Raspagem dentária; aplainamento radicular; sangue; fibrina; camada de esfregaço; raiz dentária.

ABSTRACT

LEITE, F.R.M. **Effect of the root conditioning with citric acid, sodium citrate, EDTA and tetracycline on blood elements adhesion. A scanning electron microscopy study.** 2006. 138 f. Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

ABSTRACT

Root scaling generates a smear layer which contains microorganisms and toxins that could interfere in periodontal healing. For this reason, different substances have been used to remove it and to expose collagen fibers from tooth surface. Blood elements adhesion to demineralized roots and clot stabilization by collagen fibers are extremely important for the success of periodontal surgery. The aim of this study was to evaluate the different patterns of blood elements adsorption and adhesion to root surfaces chemically conditioned. Seventy five teeth were planed and equitably divided into five groups: irrigation with distilled water (control), application of a 25% citric acid solution, 30% sodium citrate solution, 24% EDTA gel and 50 mg/mL tetracycline hydrochloride. Half of the conditioned surface was exposed to fresh blood and prepared for scanning electron microscopy. Planed root surfaces and conditioned with EDTA and citric acid showed better results when compared to control group. Citric acid was more effective on smear layer removal and blood elements adhesion

to root surface than tetracycline and sodium citrate. Also, the relationship between collagen fibers exposure and blood elements adhesion was positive. This way, EDTA and citric acid employment on root surface improve blood element adsorption and adhesion to root surface and fibrin network stabilization.

Keywords: Dental scaling; root planning; blood; fibrin; smear layer; tooth root.

ANEXOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

Comitê de Ética em Pesquisa



Certificado

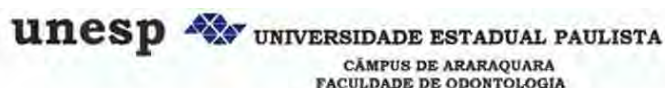
Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**EFEITO DO CONDICIONAMENTO RADICULAR NA ADESÃO DE CÉLULAS SANGÜÍNEAS SOBRE SUPERFÍCIES RADICULARES**", sob o protocolo nº 10/04, de responsabilidade do Pesquisador (a) **JOSE EDUARDO CEZAR SAMPAIO**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOAr, com validade de 03 (três) anos, quando será avaliado o relatório final da pesquisa.

Certify that the research project titled "**BLOOD CELLS ADHESION AFTER ROOT SURFACE ETCHING**", protocol number 10/04, under Dr **JOSE EDUARDO CEZAR SAMPAIO** responsibility, is under the terms of Conselho Nacional de Saúde/MS resolution # 196/96, published on May 10, 1996. This research has been approved by Research Ethic Committee, FOAr-UNESP. Approval is granted for 03 (three) year when the final review of this study will occur.

Araraquara, 22 de abril de 2004.

Prof^ª Dr^ª **Mirian Aparecida Onofre**
Coordenadora

ANEXO 2



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Por esse instrumento particular, declaro, para os devidos fins éticos e legais, que eu (nome) _____, R.G./CIC _____,

(nacionalidade) _____, (profissão) _____, residente à Rua/ Av. _____, na cidade de _____, Estado _____, concordo em participar da pesquisa intitulada: **“Efeito**

do condicionamento radicular na adesão de células sangüíneas sobre superfícies radiculares”. Fui informado que o objetivo desta pesquisa é analisar, através dos dentes extraídos, a ação de algumas substâncias químicas (EDTA, tetraciclina, ácido cítrico, citrato de sódio e lasers), na quantidade de sangue que irá se unir sobre a raiz desses dentes. Fui esclarecido que, para tanto, serão selecionados pacientes que necessitem extrair seus dentes por doença periodontal avançada, para a pesquisa.

Após ter lido e assinado este termo, eu autorizo na doação do(s) dente(s) _____, que serão extraídos na Faculdade de Odontologia de Araraquara, por indicação terapêutica, para a realização deste trabalho citado acima, bem como o uso para a divulgação e publicação em revistas científicas, brasileiras ou estrangeiras, dos dados obtidos na pesquisa. Recebi a garantia de sigilo de minha identidade, assegurando a minha privacidade.

Fui esclarecido que tenho plena liberdade para desistir da referida pesquisa, retirando o meu consentimento a qualquer momento, sem sofrer nenhum tipo de penalização, e que tenho plena liberdade de contactar o pesquisador responsável, **Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio**, pelo telefone (016) 201-6374, para obter quaisquer esclarecimentos ou o Comitê de Ética em Pesquisa, para qualquer informação adicional em relação à pesquisa da qual participo, pelo telefone (016) 201-6432 ou (016) 201 6434.

Desta forma, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos e, por estar de pleno acordo com o que está escrito acima, dato e assino esse Termo de Consentimento.

Araraquara, ____ de _____ de 200__.

Assinatura do Paciente

Assinatura do Pesquisador

ANEXO 3

UNESP **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CÂMPUS DE ARARAQUARA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Rua Humaitá, 1680 - CEP 14801-903 - Caixa Postal 331 - Fax (0xx16) 201-6314 - Araraquara - SP
Fone: (0xx16) 201-6343 / e-mail: odsocial@foar.unesp.br / Home page: <http://www.foar.unesp.br>

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu,....., portador do RG nº
....., com anos, estado civil e residente
a....., nº.....
cidade/U.F., telefone....., declaro ter sido
esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. O trabalho a ser realizado tem caráter científico, tendo por finalidade a tentativa de se descobrir uma técnica nova para adesão de células do meu sangue sobre a raiz dental.
2. Ao participar desse trabalho, estarei contribuindo para a tentativa de melhorar a recuperação do tecido gengival e sua saúde nos vários procedimentos clínicos odontológicos.
3. Doarei o que exceder desses 5 mL de tecido sangüíneo a serem retirados, após a realização dos exames laboratoriais, sendo estes hemograma e coagulograma, para aplicação sobre as amostras dentais.
4. Tenho ciência de que os resultados desses exames citados no item 3, poderão ser divulgados quando da publicação deste trabalho, mas tenho garantida a preservação de minha identidade.
5. Todo o procedimento poderá ser documentado por meio fotográfico, desde que não haja meios para identificar-me.
6. Minha preocupação como voluntário deverá se restringir apenas à utilização deste material.
7. Tenho ciência de que a coleta do sangue será realizada por pessoal capacitado, sob supervisão de uma enfermeira padrão para evitar e minimizar riscos e danos previamente me esclarecidos.
8. Os materiais utilizados para a coleta serão todos descartáveis.
9. Não terei nenhuma despesa ao participar desse estudo.
10. Meu nome será mantido em sigilo, assegurando assim minha privacidade e se desejar, deverei ser informado sobre os resultados dessa pesquisa.
11. Qualquer pergunta ou novidade sobre os procedimentos a serem realizados ou em relação a pesquisa, que surgirem durante o período experimental, serão esclarecidos e respondidos a mim, mesmo que isso implique em desistência.
12. Além disso, tenho ciência de que posso me retirar da pesquisa a qualquer momento, sem sofrer nenhum prejuízo ou causar dano a pesquisa em andamento, aos pesquisadores ou a qualquer tratamento a ser realizado

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE ARARAQUARA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Rua Humaitá, 1680 - CEP 14801-903 - Caixa Postal 331 - Fax (0xx16) 201-6314 - Araraquara - SP
 Fone: (0xx16) 201-6343 / e-mail: odsocial@foar.unesp.br / Home page: http://www.foar.unesp.br

posteriormente nesta faculdade.

13. Tomei conhecimento de que o procedimento para coleta de sangue não gera qualquer dano físico ou financeiro, principalmente em quantidades inferiores a 100 mL, não havendo a necessidade de ser indenizado por parte da equipe responsável ou pela instituição (FOAr/UNESP).
14. Em caso de problemas ou dúvidas devo procurar o pesquisador **Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio** no telefone **(16) 235-2758**.
15. E em caso de reclamações, recursos ou notificação de anormalidade que não possa ser resolvida pelos pesquisadores, deverei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia, Campus de Araraquara - UNESP, pelos telefones **(16) 201-6432 ou 201-6434**.

Assim, após ter recebido as informações sobre a pesquisa intitulada **“Efeito do condicionamento radicular na adesão de células sangüíneas sobre superfícies radiculares”**, tendo como pesquisador responsável **Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio**, consinto na retirada de **10 (dez) mL de tecido sangüíneo**, bem como sua respectiva **doação a esta pesquisa**, a fim de posterior utilização em pesquisa científica.

..... de de 200...

.....
 Assinatura do paciente

.....
 Assinatura do pesquisador responsável

Pesquisador **CRO.....**



bioquímica
imunologia
hematologia
parasitologia
microbiologia
biologia molecular
marcadores tumorais

Paciente: **FABIO RENATO MANZOLLI LEITE**

Idade.....: **23 Anos**

Médico...: **REINALDO BONFA**

Data.....: **21/10/2005**

Convênio.....:

Código: **350629**

Unidade.....: **0000000**

Requisição.....:

HEMOGRAMA

Material: Sangue

Método: Contador Eletrônico Coulter STKS

ERITROGRAMA

	VALORES ENCONTRADOS	VALORES DE REFERENCIA ADULTO	
		Homem	Mulher
Eritrócitos em milhões/mm ³	6,17	4,50 - 6,00	4,00 - 5,50
Hemoglobina em g/dl.....	17,8	13,0 - 17,0	11,5 - 16,0
Hematócrito em ml/dl.....	52,0	38 - 52	35 - 47
V.C.M. em fL.....	84,3	82 - 98	
H.C.M. em pg.....	28,8	27 - 32	
C.H.C.M. em %.....	34,2	32 - 36	
R.D.W. em %.....	12,4	11,5 - 14,5	

Sem alterações morfotintoriais.

LEUCOGRAMA

	VALORES ENCONTRADOS		VALORES DE REFERENCIA ADULTO	
	%	por mm ³		
Leucócitos.....		8.300		4.500 a 11.000
Neutrófilos.....	70,0	6.059	50 a 70	2.250 a 7.700
Bastonetes.....	2,0	166	0 a 6	0 a 660
Segmentados.....	61,0	5.893	50 a 67	2.250 a 7.370
Eosinófilos.....	2,0	166	1 a 4	45 a 440
Basófilos.....	0,0	0	0 a 1	0 a 110
Linfócitos típicos.....	16,0	1.328	20 a 40	900 a 4.400
Linfócitos atípicos.....	1,0	83	0	0
Monócitos.....	8,0	664	4 a 10	180 a 1.100

Responsável:

Prof. Dr. Amauri Antiquera Leite
CRF-8-7943



"Centro de Referência Diagnóstica Professor Dr. Antônio Longo"

Rua Expedicionários do Brasil 1621 Centro Araraquara SP cep 14801-360 fone 16 33016100 www.nac-unesp.org.br



hormônios
bioquímica
imunologia
hematologia
parasitologia
microbiologia
biologia molecular
marcadores tumorais

Paciente: **FABIO RENATO MANZOLLI LEITE**

Idade: **23 Anos**

Médico: **REINALDO BONFA**

Data: **21/10/2005**

Convênio: **.....**

Código: **350629**

Unidade: **0000000**

Requisição: **.....**

COAGULOGRAMA

Material: **Sangue**

	VALORES DE REFERENCIA	METODO
TEMPO DE COAGULACAO...: 7 min 0 seg	5 a 10 minutos	LEE-WHITE
TEMPO DE SANGRAMENTO...: 1 min 0 seg	Até 3 minutos	DUKE
PROVA DE LACO.....: Negativo	Negativo	RUMPELL-LEED
RETRACAO DO COAGULO...: Completa	Completa	
CONTAGEM DE PLAQUETAS: 273.000 /mm3	150.000 a 450.000	ELETRONICO STKS

TEMPO DE PROTOMBINA

Relação Paciente/Controle...: 1,20	1,0 a 1,2
INR.....: 1,26	1,0 a 1,4 2,5 a 4,0 Controle Terapeutico

TEMPO DE TROMBOPLASTINA

Paciente: 31 segundos	
Controle: 30 segundos	
Relação Paciente/Controle...: 1,03	até 1,3 CEFALINA ATIVADA

Responsável:

Prof. Dr. Amauri Antiquera Leite
CRF-8-7943

ANEXO 4

Tabela A1 – Escore atribuído às fotomicrografias do grupo controle (G1)
analisado pelo Índice de Biomodificação Radicular (IBR)

Foto (2000x)	Leituras			Escore final
	1	2	3	
290960	3	3	3	3
290940	3	3	3	3
290975	3	3	3	3
290938	3	3	3	3
290959	3	3	3	3
290942	3	3	3	3
290958	3	3	3	3
290974	3	3	3	3
290964	3	3	3	3
290937	2	3	3	3
290962	2	3	3	3
290963	3	3	3	3
290951	3	3	3	3
290961	3	3	3	3
290957	2	2	2	2

Tabela A2 – Escore atribuído às fotomicrografias do grupo EDTA (G2)
 analisado pelo Índice de Biomodificação Radicular (IBR)

Fotomicrografia (2000x)	Leituras			Escore final
	1	2	3	
290946	2	2	2	2
290941	1	1	1	1
290955	1	1	1	1
290948	1	1	1	1
290949	2	2	2	2
290945	1	1	1	1
290943	2	2	2	2
290947	2	2	2	2
290954	2	2	2	2
290950	2	2	2	2
290952	2	2	2	2
290956	2	2	2	2
290953	2	2	2	2
290944	2	2	2	2
290936	2	2	2	2

Tabela A3 – Escore atribuído às fotomicrografias do grupo ácido cítrico (G3) analisado pelo Índice de Biomodificação Radicular (IBR)

Fotomicrografia (2000x)	Leituras			Escore final
	1	2	3	
280910	2	2	2	2
280902	2	2	2	2
280903	1	1	1	1
290966	2	2	2	2
280911	1	1	1	1
290967	2	2	2	2
280907	1	1	1	1
280904	2	2	2	2
280913	1	1	1	1
280912	2	2	2	2
280914	1	1	1	1
290965	1	1	1	1
280906	1	1	1	1
280905	1	1	1	1
280901	1	1	1	1

Tabela A4 – Escore atribuído às fotomicrografias do grupo cloridrato de tetraciclina (G4) analisado pelo Índice de Biomodificação Radicular (IBR)

Fotomicrografia (2000x)	Leituras			Escore final
	1	2	3	
280909	2	2	2	2
290970	2	2	2	2
290939	2	2	2	2
290968	2	2	2	2
290969	2	2	2	2
280908	2	2	2	2
280923	2	2	2	2
280924	2	2	2	2
280925	2	2	2	2
280926	2	2	2	2
280927	2	2	2	2
280928	2	2	2	2
280922	3	2	2	2
290932	2	2	2	2
290929	2	2	2	2

Tabela A5 – Escore atribuído às fotomicrografias do grupo citrato de sódio (G5) analisado pelo Índice de Biomodificação Radicular (IBR)

Fotomicrografia (2000x)	Leituras			Escore final
	1	2	3	
280915	2	2	2	2
290973	2	2	2	2
290930	2	2	2	2
290971	2	2	2	2
290931	2	2	2	2
280917	2	2	2	2
280918	2	2	2	2
280916	2	2	2	2
280919	2	2	2	2
280920	2	2	2	2
290933	2	2	2	2
290934	2	2	2	2
290935	2	2	2	2
280921	2	2	2	2
290972	2	2	2	2

Tabela A6 – Escore atribuído às fotomicrografias do grupo controle (G1)
 analisado pelo Índice de Adesão de Elementos Sangüíneos
 (IAES)

Fotomicrografia (500x)	Leituras			Escore final
	1	2	3	
290101	0	0	0	0
290103	1	1	0	1
290105	1	1	1	1
290107	0	0	0	0
290111	0	0	0	0
290113	2	2	2	2
290115	1	1	1	1
290117	1	1	1	1
290981	0	0	0	0
290989	0	0	0	0
290991	1	1	1	1
290993	1	1	1	1
290995	0	0	0	0
290997	0	0	0	0
290999	0	0	0	0

Tabela A7 – Escore atribuído às fotomicrografias do grupo EDTA (G2)

analisado pelo Índice de Adesão de Elementos Sangüíneos

(IAES)

Fotomicrografia (500x)	Leituras			Escore final
	1	2	3	
290119	2	2	2	2
309121	2	2	2	2
290109	2	2	2	2
309123	2	2	2	2
309125	2	1	2	2
309127	1	0	0	0
309129	2	2	2	2
309131	2	2	2	2
309133	2	2	2	2
309135	1	1	1	1
309139	0	0	0	0
309141	1	1	1	1
309143	1	0	0	0
309145	0	0	0	0
309147	1	1	0	1

Tabela A8 – Escore atribuído às fotomicrografias do grupo ácido cítrico (G3) analisado pelo Índice de Adesão de Elementos Sangüíneos (IAES)

Fotomicrografia (500x)	Leituras			Escore final
	1	2	3	
309149	2	2	2	2
309137	1	1	1	1
309151	0	0	0	0
309153	3	3	3	3
309155	2	2	2	2
309157	3	3	3	3
309159	3	3	3	3
309161	2	2	2	2
309163	2	2	2	2
309167	1	1	1	1
309169	3	3	3	3
309171	2	2	2	2
290983	3	3	3	3
290985	3	3	3	3
290987	3	3	3	3

Tabela A9 – Escore atribuído às fotomicrografias do grupo cloridrato de tetraciclina (G4) analisado pelo Índice de Adesão de Elementos Sangüíneos (IAES)

Fotomicrografia (500x)	Leituras			Escore final
	1	2	3	
290977	0	0	0	0
290979	0	0	0	0
309173	1	1	1	1
309175	1	1	1	1
309177	0	0	0	0
309165	0	0	0	0
309179	1	1	0	1
309181	1	1	1	1
309183	1	1	1	1
309185	1	1	1	1
309187	1	1	1	1
309189	2	1	1	1
309191	2	2	2	2
309193	1	1	1	1
309205	2	2	2	2

Tabela A10 – Escore atribuído às fotomicrografias do grupo citrato de sódio (G5) analisado pelo Índice de Adesão de Elementos Sangüíneos (IAES)

Fotomicrografia (500x)	Leituras			Escore final
	1	2	3	
309203	1	1	1	1
309201	1	1	1	1
309199	0	0	0	0
309197	1	1	1	1
309195	0	0	0	0
309207	0	0	0	0
309209	2	2	2	2
309211	0	0	0	0
309213	1	1	1	1
309215	2	2	2	2
309217	1	1	1	1
309219	0	0	0	0
061221	0	0	0	0
061223	0	0	0	0
061225	0	0	0	0