



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA



ANDRÉA ABI RACHED DANTAS

**EFEITO DO CONDICIONAMENTO
RADICULAR COM DIFERENTES AGENTES
PARA A ADESÃO DE PLASMA RICO EM
PLAQUETAS E DE CÉLULAS SANGÜÍNEAS.
ESTUDO IN VITRO.**

ARARAQUARA

2008



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA



ANDRÉA ABI RACHED DANTAS

**EFEITO DO CONDICIONAMENTO
RADICULAR COM DIFERENTES AGENTES
PARA A ADESÃO DE PLASMA RICO EM
PLAQUETAS E DE CÉLULAS SANGÜÍNEAS.
ESTUDO IN VITRO.**

*Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Periodontia, da Faculdade de Odontologia de
Araraquara, da Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para o título de Doutor
em Periodontia.*

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

ARARAQUARA

2008

Dantas, Andréa Abi Rached.

Efeito do condicionamento radicular com diferentes agentes para a adesão de plasma rico em plaquetas e de células sanguíneas. Estudo in vitro / Andréa Abi Rached Dantas. – Araraquara: [s.n.], 2008.

131 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientador : Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio

1. Plasma rico em plaquetas 2. Camada de esfregaço 3. Ácido edético 4. Ácido cítrico 5. Tetraciclina. I. Título

ANDRÉA ABI RACHED DANTAS

**EFEITO DO CONDICIONAMENTO RADICULAR COM DIFERENTES AGENTES
PARA A ADESÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS E DE CÉLULAS
SANGÜÍNEAS. ESTUDO IN VITRO.**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio

2º Examinador: Prof^a. Dr^a. Patrícia Helena Rodrigues de Souza

3º Examinador: Prof^a. Dr^a. Marília Compagnoni Martins

4º Examinador: Prof. Dr. Elcio Marcantonio Júnior

5º Examinador: Prof. Dr. Wilson Sallum

Araraquara, 19 de março de 2008.

DADOS CURRICULARES

Andréa Abi Rached Dantas

- Nascimento 07 de Abril de 1976 – Araraquara - SP.
- Filiação Ricardo Samih Georges Abi Rached
Olga Maria Vicentin Abi Rached
- 1995-1998 Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade de
Ribeirão Preto - UNAERP
- 1998-2002 Curso de Graduação em Pedagogia pelo Centro Universitário de
Araraquara - UNIARA
- 1999-2000 Curso de Especialização em Dentística Restauradora pela FAEPO
– UNESP - Araraquara
- 2002-2003 Curso de Pós-graduação em Odontologia, Área de Periodontia,
Nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara –
UNESP.
- 2004-2008 Curso de Pós-graduação em Odontologia, Área de Periodontia,
Nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara
– UNESP.
- 2007- Professora de Graduação nas Disciplinas de Periodontia e
Terapêutica Medicamentosa do Centro Universitário de
Araraquara – UNIARA.

**“If I could be you, if you could be me
For just one hour, if we could find a way
To get inside each other's mind
If you could see you through my eyes
Instead your own ego I believe you'd be
I believe you'd be surprised to see
That you've been blind**

**Walk a mile in my shoes
just walk a mile in my shoes
Before you abuse, criticize and accuse
Then walk a mile in my shoes**

**Now if we spend the day
Throwin' stones at one another
'Cause I will think, 'cause I will think
To wear my hat the same way you do
Well, I may be common people
But I'm your brother
And when you strike out
You're tryin' to hurt me
It's hurtin' you, Lord how mercy**

**Now there are people on reservations
And out in the ghetto
And whether they're for the grace of God
Or you and I,
If I only had wings of a little angel
Don't you know, I'd fly
To the top of a mountain
And then I'd cry, cry, cry”**

Walk A Mile In My Shoes, Elvis Presley

Composição: Indisponível

DEDICATÓRIA

**A *DEUS*, agradeço e dedico este trabalho,
principalmente, por não ter me deixado desistir quando
a vontade era grande, por ter me ajudado a
manter a fé e a esperança, demonstrando em todos
os segundos da minha vida que há pessoas,
lugares e “milagres” muito maiores do que
a pobreza de espírito daqueles que
só sabem viver para competir.**

Dedico esse Trabalho a minha Família

Ao meu pai *Ricardo Samih Geoges Abi Rached*, por transmitir o amor à profissão e pelo exemplo de ser uma pessoa que tem a certeza de que “nunca é tarde para se começar alguma atividade”;

A minha mãe *Olga Maria Vicentin Abi Rached*, por estar sempre ao meu lado nos momentos difíceis, por não ter me deixado largar este curso e por cuidar “como mãe” da minha filha;

Ao meu irmão *Ricardo*, porque dentro de todo o sofrimento que já passou nesta vida, me fez enxergar o quanto é importante olhar para os lados nos momentos de dor;

Ao meu sobrinho *Enzo*, pois veio ao mundo com a missão de salvar, alegrar e iluminar cada dia de vida do meu irmão e de todos nós;

Ao meu marido *Régis*, meu amor, minha alma gêmea, pelo seu sorriso constante, seu otimismo e por acreditar que eu tenho capacidade e competência para ser uma boa profissional e uma super mãe para os seus, nossos filhos.

A minha filha *Gabriela*,

“Filhos... Filhos? / Melhor não tê-los! / Mas se não os temos / Como sabê-los? / Se não os temos / Que de consulta / Quanto silêncio / Como os queremos!- Banho de mar / Diz que é um porrete... / Cônjuge voa / Transpõe o espaço / Engole água / Fica salgada / Se iodifica / Depois, que boa / Que morenaço / Que a esposa fica! / Resultado: filho. / E então começa / A aporrinhação: / Cocô está branco / Cocô está preto / Bebe amoníaco / Comeu botão. / Filhos? Filhos... / Melhor não tê-los / Noites de insônia / Cãs prematuras / Prantos convulsos / Meu Deus, salvai-o! / Filhos são o demo / Melhor não tê-los... / Mas se não os temos / Como sabê-los? / Como saber / Que macieza / Nos seus cabelos / Que cheiro morno / Na sua carne / Que gosto doce / Na sua boca! / Chupam gilete / Bebem xampu / Ateiam fogo / No quarteirão / Porém, que coisa / Que coisa louca / Que coisa linda / Que os filhos são!”

(*Poema enjoadinho*, Vinicius de Moraes)

Você me fez conhecer um amor que somente os pais conhecem. É indescritível, inconseqüente e, acima de tudo incondicional. Ter tido você durante o Doutorado nunca me fez se arrepender das coisas que talvez eu não tenha feito pelo curso. Muito pelo contrário! Deu-me o prazer, a felicidade de estar fazendo algo que os outros não estavam: ser sua mamãe, sentir seu cheirinho, ver suas gargalhadas, suas travessuras e, depois, ganhar um monte de beijos e ouvir um “eu te

amo, mamãe. Fique com Deus”!!!

Amo você com todas as minhas forças!!!!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, *Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio*, o meu “muito obrigada” por não ter desistido de mim, pela paciência, pelo bom humor e, acima de tudo, por ter me ajudado tanto nestes quase 6 anos. Desculpe pelas falhas, pelos “desencontros” de palavras e pelos possíveis transtornos que eu tenha vindo a te causar.

Aos grandes amigos que fiz nestes anos: *Juliana Ríco, Elizangela Zuza, Patrícia e Carlos Nassar* (os futuros papais do Fernando!), *Clíciane Sousa, Luiz Henrique Batista* e *Beatriz Maria Valério Lopes*, pelos momentos de descontração, risadas e trabalhos juntos.

A equipe de trabalho formada pelos colegas *Daniela Leal Zandim, Fábio Renato Manzolli Leite e Rodrigo Cavassim* pela colaboração e pelo aprendizado que trocamos durante nossos preparos das amostras.

Aos professores da Disciplina de Periodontia, *Benedicto Egbert Correa de Toledo, Ricardo Samih Georges Abi Rached, Elcio Marcantonio Júnior, José Eduardo Cezar Sampaio, Rosemary Adriana Chiéricsi Marcantonio, Silvana Regina Perez Orrico, Joni Augusto Cirelli, Carlos Rossa Júnior e Gloria Maria de Azevedo Thompson Galli*, pela paciência e dedicação ao curso de Pós Graduação em Periodontia;

Aos professores *Joni Augusto Cirelli, Carlos Rossa Jr e Silvana Regina Perez Orrico*, coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Periodontia da

FOAr-UNESP, que exerceram a sua função durante o curso de Doutorado, assim como a todos os membros do Conselho de Curso e por poder defender esta tese.

A Faculdade de Odontologia de Araraquara, representada por sua diretora, *Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérnici Marcantonio*, que me proporcionou a formação no curso de Pós-Graduação.

Às funcionárias da Disciplina de Periodontia, *Maria do Rosário Bento Clemente, Maria Teresinha Galli, Maria José da Silva Miquelon, Ana Cláudia Gregolim Miranda*, pela amizade, atenção e disponibilidade e pelo carinho e respeito com que sempre me trataram.

A *Regina Lúcia da Silva*, secretária da Disciplina de Periodontia, que me ajudou muito durante o curso. Sua disponibilidade, atenção, conselhos, risadas e seu carinho foram muito importantes em vários momentos difíceis pelos quais eu passei.

A *Thelma Aparecida Gomes*, ao *Antônio Medeiros Filho* e à *Sueli de Fátima Marrega Falcosk*, da secretaria do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, pela atenção, disponibilidade e cooperação.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara, *Maria Helena Matsumoto Komasti Leves, Ceres Maria Carvalho Galvão de*

Freitas, Marley Cristina Chiusoli Montagnoli, Eliane Cristina Marques de Mendonça Spera, Maria Aparecida Capella Carvalho, Odete Aparecida Camilo, Adriano Ferreira Luiz, Eliane Maria Sanches Scarso, Maria Inês Carlos, Sílvia Helena Acquarone Lavras, os quais sempre se mostraram solícitos e prestativos em todas as vezes que fui procurá-los.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, *Mara Cândida Munhoz do Amaral, Rosângela Aparecida Silva dos Santos, José Alexandre Garcia, Flávia Sousa de Jesus*, pela atenção, paciência e vontade em cooperar.

Aos meus colegas *Ana Emília Farias Pontes, Beatriz Maria Valério Lopes, Carla Raquel Fontana, Carlos Augusto Nassar, Daniela Gonçalves, Daniela Leal Zandim, Eduardo de Paula Ishi, Elizângela Partata Zuza, Fábio Renato Manzolli Leite, Fernanda Bello, Fernando Salimon Ribeiro, Gabriela Giro, Ivy Kjemle Trindade, Juliana A. N. de Moraes, Juliana Rico Pires, Mauricio Ribeiro Costa, Patrícia O. Nassar, Rafael Sartori, Rafael Silveira Faeda, Rodrigo Cavassim, Romeu B. Fernandez Filho, Vanessa Camila da Silva*, pela convivência, pelo companheirismo e pela oportunidade de amizade.

Aos 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.

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 *pacientes* que cederam seus dentes para realização desta pesquisa.

A *CAPES*, pelo apoio financeiro.

Sumário

RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	18
INTRODUÇÃO.....	20
REVISÃO DA LITERATURA.....	25
PROPOSIÇÃO.....	56
MATERIAL E MÉTODO.....	58
Seleção dos dentes.....	59
Preparo dos dentes.....	60
Visualização das fibras colágenas.....	64
Aplicação do Plasma Rico em Plaquetas.....	67
Aplicação do Plasma Rico em Plaquetas e do sangue.....	71
Avaliação em microscopia eletrônica de varredura.....	73
Análise das fotomicrografias.....	74
RESULTADO.....	80
DISCUSSÃO.....	88
CONCLUSÃO.....	100
REFERÊNCIAS.....	103
ANEXOS.....	120

RESUMO

Dantas AAR. Efeito do condicionamento radicular com diferentes agentes para a adesão de Plasma Rico em Plaquetas e de Células Sangüíneas. Estudo in vitro. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

RESUMO

A remoção da *smear layer* e a exposição da matriz colágena da dentina de superfícies radiculares desprovidas de sua inserção conjuntiva tem o potencial de auxiliar o tratamento e/ou a regeneração periodontal. 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 plasma rico em plaquetas (PRP) e de PRP + células sangüíneas a superfícies radiculares quimicamente condicionadas. Oitenta dentes foram raspados, eqüitativamente divididos em 5 grupos: irrigação com soro fisiológico (controle), aplicação de solução de ácido cítrico a 25%, gel de EDTA a 24%, solução de cloridrato de tetraciclina a 50mg/mL e solução de citrato de sódio a 30%. Metade das superfícies condicionadas foi exposta ao PRP e a outra metade ao PRP e sangue fresco para avaliação com microscopia eletrônica de varredura. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos quando aplicou-se o PRP seguido de sangue. O EDTA e o ácido cítrico mostraram-se mais efetivos na remoção de *smear layer*, porém o ácido cítrico foi o único agente que apresentou adesão de PRP nas superfícies radiculares. Dessa forma, o emprego do PRP sobre a

superfície radicular pareceu favorecer a adsorção e adesão de células sangüíneas e a estabilização da rede de fibrina.

Palavras-chave: plasma rico em plaquetas, camada de esfregaço, ácido edético, ácido cítrico, tetraciclina.

ABSTRACT

Dantas AAR. Effect of the root conditioning with different agents on rich-platelet plasma and blood cells adhesion. An in vitro study. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

ABSTRACT

Smear layer removal and collagen fibers exposure may improve periodontal treatment and regeneration. 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 platelet – rich plasma (PRP) and PRP + blood cells adsorption and adhesion to root surfaces chemically conditioned. Eighty teeth were planed and equitably divided into five groups: irrigation with saline solution (control), application of a 25% citric acid solution, 24% EDTA gel, 50mg/mL tetracycline hydrochloride and 30% sodium citrate solution. Half of the conditioned surface was exposed to PRP and another half to the PRP and fresh blood and prepared for scanning electron microscopy. Planed root surfaces and conditioned with EDTA and citric acid were more effective on smear layer removal, but citric acid was the only agent that showed blood cells adhesion to root surface. This way, PRP employments on root surface probably improve blood element adsorption and adhesion to root surface and fibrin network stabilization.

Keywords: platelet – rich plasma, smear layer, edetic acid, citric acid, tetracycline.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A doença periodontal é multifatorial, mas tem como agente etiológico principal o biofilme bacteriano, sendo que os produtos metabólicos destas bactérias acabam por produzir toxinas capazes de se fixar à superfície do cimento, promovendo uma constante irritação tecidual e destruição progressiva do periodonto de sustentação⁷⁶.

O tratamento básico para remoção destes agressores locais é a raspagem e o aplainamento radicular (RAR) que, além de muitas vezes, não remover todo o depósito mineralizado presente, promove a formação de *smear layer*, uma camada de restos de cálculo dental, biofilme, cimento contaminado e toxinas bacterianas^{20,54}.

A fim de remover *smear layer*, Polson, Caton⁸³ (1982) observaram em seu estudo que raízes comprometidas pela doença periodontal sofrem alterações, tornando-se inadequadas à adesão celular e inserção de fibras colágenas, apresentando, como um dos motivos, a presença desta camada de “debris” na superfície radicular. Aleo et al.² (1975) sugeriam que a falta de nova inserção ocorria devido à contaminação do cimento e dentina por produtos tóxicos bacterianos como endotoxinas, porém Nalbandian, Cote⁷⁵ (1982), por meio de estudo em raízes saudáveis, observaram que o problema era causado pela presença ou ausência de *smear layer*.

Um condicionamento radicular que promova a remoção de *smear layer* sem afetar a porção orgânica da matriz e seu potencial indutivo tem sido

determinado como um importante fator para favorecer a formação de cimento, osso alveolar e ligamento periodontal, pois as células capazes de sintetizar estes tecidos podem aderir-se às raízes^{13,23,117}.

Vários estudos *in vitro* e *in vivo*, com diferentes agentes químicos têm sido realizados para avaliar a eficiência do condicionamento radicular na remoção da *smear layer* e na exposição de fibras colágenas de dentina^{1,14,15,82,86,91,92}.

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, contra-indicam o seu uso^{18,19,41,55,86}.

O Cloridrato de Tetraciclina (TTC HCl), em estudos realizados *in vitro*, provocou melhor inserção conjuntiva em superfícies tratadas, mesmo com baixo pH^{28,36,105,116}, podendo, segundo Terranova¹⁰⁴ (1982), haver aumento da união da glicoproteína fibronectina à dentina, estimulando a proliferação e a adesão de fibroblastos, como também promover a supressão da inserção e do crescimento das células epiteliais^{36,51}. Entre outras propriedades dos TTC HCl, tem-se: atividade anti-colagenase⁴², inibição da função de osteoclastos⁴³ e da função dos neutrófilos³⁸, eficiente substantividade^{10,11,51}, capacidade de manutenção de sua atividade antimicrobiana por períodos variando de 48 horas¹¹⁶ à 14 dias^{27,98} e exposição de fibras colágenas em baixas concentrações¹.

Uma alternativa proposta às substâncias de baixo pH foi o EDTA, o qual, de modo diferente aos agentes anteriores que desmineralizam a superfície

dentária, é um potente quelante de íons cálcio sendo capaz de remover apenas a matriz inorgânica, preservando a rede de fibras colágenas^{9,16,18-20,39,55}.

Outra substância com propriedade quelante semelhante ao EDTA é o Citrato de Sódio. Apesar de não serem encontrados estudos em que este seja empregado na biomodificação radicular, trabalhos testando sua toxicidade³⁴ e cinética molecular⁷⁷ justificam sua escolha para este fim. O Citrato de Sódio é o anticoagulante de escolha para bolsas de sangue, visto que apresenta menor grau de toxicidade celular do que o EDTA³⁴. Outro fator importante é que o Citrato de Sódio apresenta uma ligação ao íon cálcio mais fraca em relação ao EDTA, sugerindo uma reação mais controlada, o que pode facilitar sua remoção da superfície dental⁷⁷. Segundo Lan et al.⁵⁹ (1999), o Citrato de Sódio apresenta características citotóxicas para fibroblastos gengivais menos acentuadas do que o ácido cítrico.

O tratamento periodontal regenerativo tem como um de seus objetivos promover a inserção do tecido conjuntivo sobre a superfície radicular acometida pela doença periodontal. A fase inicial do processo de cicatrização dos tecidos do periodonto se dá pela formação e adesão do coágulo sangüíneo, mediada por proteínas plasmáticas, principalmente, o fibrinogênio^{37,49,84,119}.

Para que ocorra a reinserção ou nova inserção do tecido conjuntivo na superfície radicular deve haver a adesão da rede de fibrina sobre a raiz⁷⁸. Sendo assim, quanto mais rápida for a aderência do coágulo sangüíneo sobre esta superfície, maior será a possibilidade de que não haja formação de epitélio juncional longo^{25,118}. De acordo com alguns autores^{9,25,53,99}, uma rede de fibrina

estável e insolúvel, promovida pela ativação e agregação plaquetária, formaria um arcabouço, um receptáculo favorável para a migração celular e para o desenvolvimento do mecanismo de adesão de células do tecido conjuntivo.

As plaquetas participam ativamente no mecanismo trombotinâmico da coagulação, emitindo pseudópodos que proporcionam a adesividade interplaquetária e conseqüente formação do trombo plaquetário. Também têm a capacidade de atuação por meio da liberação de mediadores químicos que participam do processo inflamatório e da reparação tecidual⁸⁹. Sendo assim, têm como funções principais, a hemostasia, a coagulação sangüínea e a cicatrização, por meio da liberação de fatores de crescimento¹¹⁵.

Atualmente, o gel de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) tem sido utilizado como um grande aliado na regeneração periodontal. Ele é formado por meio da centrifugação do sangue autógeno, sendo que este concentrado de plaquetas é ativado pelo cloreto de cálcio. O resultado desta ativação é a liberação de uma cascata de fatores de coagulação e fatores de crescimento presentes nos grânulos destas plaquetas⁹³.

Dessa forma, apesar dos estudos ainda serem inconclusivos quanto à eficiência, melhor modo, tempo e concentração dos agentes químicos estudados na literatura, bem como, se seria viável a utilização benéfica de PRP e a estabilização do coágulo sangüíneo em superfícies radiculares, parece oportuna a avaliação *in vitro* de alguns agentes condicionantes associados ao PRP e/ou PRP + sangue.

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DE LITERATURA

Devido à extensa presença de estudos relacionados aos agentes condicionantes para observar sua atuação na remoção de *smear layer* e exposição de fibras colágenas, bem como, vasta literatura referente à utilização do Plasma Rico em Plaquetas (PRP), este capítulo será dividido em tópicos para facilitar o entendimento da proposta desta pesquisa. Cada item seguirá sua própria ordem cronológica.

Estudos in vitro com agentes condicionantes:

Em 1978, Garrett et al.⁴¹ 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.

Polson, Proye⁸⁴ (1982) avaliaram o efeito do condicionamento ácido da superfície radicular desprovida, em sua porção mais coronária, de cimento e de fibras do ligamento periodontal. Foram extraídos 12 dentes

provenientes de quatro macacos e, após remoção do cimento e do ligamento periodontal, aplicou-se ácido cítrico com pH 1.0, nas superfícies radiculares, durante 3 minutos, sendo que, imediatamente após lavagem com solução salina, procedeu-se o reimplante destes dentes em seus respectivos alvéolos. A avaliação histológica realizada depois de 1, 3, 7 e 21 dias demonstrou que, no grupo tratado com ácido cítrico, pôde ser observada, inicialmente, a deposição de uma zona de fibrina contendo leucócitos polimorfonucleares (PMNs) e eritrócitos, sem haver, contudo, a migração apical do epitélio juncional, mesmo nos períodos subseqüentes, ao contrário dos dentes não submetidos ao condicionamento radicular. Após 21 dias, houve reinserção de tecido conjuntivo, sem evidências de cementogênese. Entretanto, os autores puderam observar extensas áreas de reabsorção radicular na porção intra-alveolar da raiz.

Cogen et al.²⁹ (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.

Um dos primeiros trabalhos relacionados ao emprego da Tetraciclina no condicionamento da superfície radicular, em Periodontia, foi de Wikesjö et al.¹¹⁶ (1986), os quais avaliaram a capacidade de adsorção e de liberação do cloridrato de tetraciclina marcada, em diferentes concentrações, à superfície dentinária, bem como o aspecto morfológico desta superfície após condicionamento com as soluções, quando observada ao microscópio eletrônico de varredura. As soluções com concentrações superiores a 50mg/mL mostraram os maiores valores de adsorção. Valores acima da concentração inibitória mínima (CIM) para a maioria das bactérias patogênicas foram mantidos por períodos de, no mínimo, 48 horas. Frente à análise microscópica, as superfícies radiculares mostraram-se livres de *smear layer*, com exposição dos túbulos dentinários, semelhante ao que se observava com o ácido cítrico. O emprego do cloridrato de tetraciclina no condicionamento radicular demonstrou algumas vantagens, como: 1) adsorção à superfície radicular e, como consequência, boa substantividade, mantendo o efeito antimicrobiano por um período mais prolongado; 2) inibição da colagenase; 3) remoção de *smear layer* e exposição de fibras colágenas, podendo vir a favorecer o processo de regeneração periodontal.

Frantz, Polson³⁶ (1988) avaliaram o efeito da desmineralização da dentina por cloridrato de tetraciclina na adesão celular sobre fragmentos de dentina. As amostras, obtidas de raízes não afetadas por periodontite, foram tratadas com TTC HCL 100mg/mL (pH 1.9) e 200mg/mL (pH 1.7) por 5 minutos. Um terceiro grupo permaneceu sem tratamento e serviu como controle. Quatro amostras de cada grupo permaneceram implantadas na superfície dorsal de ratos

por um dia e quatro amostras permaneceram implantadas por dez dias. Após análises histológicas e histométricas, verificou-se que nas superfícies tratadas havia maior número de células aderidas, não havendo diferenças entre os tempos de implantação e as concentrações de cloridrato de tetraciclina. Entretanto, no período de 10 dias os autores observaram um número significativamente menor de células em contato com a superfície dental, não havendo formação de nova inserção. Os autores relataram que o ácido cítrico, quando utilizado em modelo experimental semelhante, resultou em maior adesão celular à superfície dental com conseqüente nova inserção. Finalmente, concluíram que as superfícies dentinárias desmineralizadas por cloridrato de tetraciclina promoveram um substrato que aumentou a adesão celular sem, no entanto, resultar na inserção de tecido conjuntivo.

Fardal, Lowenberg³⁵ (1990) estudaram, durante 21 dias, o crescimento de fibroblastos em 120 fragmentos de dentina originados de dentes saudáveis e com doença periodontal divididos em 9 grupos de fragmentos provenientes de: 1) raízes de dentes com doença periodontal que receberam raspagem e alisamento radicular (RAR), 2) raízes de dentes com doença periodontal que receberam raspagem e alisamento radicular e condicionamento com ácido cítrico, 3) raízes de dentes com doença periodontal que não receberam tratamento, 4) raízes de dentes com doença periodontal que receberam condicionamento com ácido cítrico, 5) raízes de dentes saudáveis, 6) raízes de dentes saudáveis que receberam condicionamento com ácido cítrico, 7) raízes de dentes saudáveis que receberam condicionamento com ácido cítrico e colagenase,

8) raízes de dentes saudáveis que receberam condicionamento com EDTA e 9) raízes de dentes saudáveis que receberam condicionamento com EDTA e colagenase. Os autores concluíram que a associação da raspagem e alisamento radicular com o condicionamento químico com EDTA ou ácido cítrico produziu uma superfície com biocompatibilidade comparável a da superfície não exposta à doença periodontal e que o condicionamento de superfícies dentais expostas à doença não apresentou diferença de biocompatibilidade quando comparado a superfícies que receberam raspagem e alisamento radicular. Além disso, a exposição da matriz de colágeno da estrutura dental por si não explica a melhor biocompatibilidade, uma vez que a digestão do colágeno dental utilizando colagenase não interferiu na biocompatibilidade aferida por meio da adesão de fibroblastos às superfícies tratadas. Outra observação relevante é que até os três dias de experimento, a adesão celular foi maior nas amostras que receberam RAR e desmineralização quando comparadas às amostras que receberam somente RAR. Os autores relataram que a descontaminação de fragmentos provenientes de dentes com doença periodontal por meio de antibiótico não tornou estes fragmentos receptivos ao crescimento celular, ou seja, a descontaminação isoladamente não foi suficiente para se obter biocompatibilidade.

Ainda neste mesmo ano, Bal et al.¹³, utilizando microscópio eletrônico de varredura, avaliaram a formação de coágulo sangüíneo em 6 dentes extraídos devido à presença de doença periodontal. Os dentes foram divididos em dois grupos individuais. No primeiro grupo, as superfícies radiculares sofreram divisão em 3 diferentes áreas de tratamento: a) ligamento periodontal intacto; b)

raspagem; 3) raspagem e aplicação de ácido cítrico a 1% (pH 1.0), por 3 minutos. No segundo grupo, a divisão foi parecida com a do grupo 1: a) ligamento periodontal intacto; b) raspagem; 3) raspagem e aplicação tópica de cloridrato de tetraciclina, por 3 minutos. Em seguida, os dentes foram recolocados em seus respectivos alvéolos, após remoção do coágulo sangüíneo, com o intuito de ativar um sangramento fresco. Os dentes foram removidos nos tempos 0 (em menos de 5 segundos), 1 ou 3 minutos e lavados com solução salina estéril. Os resultados sugeriram que a formação do coágulo sangüíneo tem início logo nos primeiros segundos de reimplante dental, sendo que um coágulo mais organizado foi observado nas superfícies tratadas com os ácidos e naquelas em que se manteve intacto o ligamento periodontal. Após 3 minutos, os autores encontraram formação mais avançada de fibrina nas superfícies radiculares tratadas com cloridrato de tetraciclina, do que naquelas tratadas com ácido cítrico, devido, provavelmente, à propriedade de desmineralização do cloridrato de tetraciclina e seu efeito antibacteriano.

Em 1992, Labahn et al.⁵⁷ avaliaram os efeitos de solução saturada de ácido cítrico e do cloridrato de tetraciclina 100mg/mL em superfícies radiculares submetidas à instrumentação. Foram preparados 20 dentes sem doença periodontal, os quais, após raspagem, tiveram divisão em 3 grupos: 1) grupo tratado com água destilada; 2) grupo tratado com ácido cítrico; 3) grupo tratado com cloridrato de tetraciclina 100mg/mL. A aplicação dos agentes foi feita por gotejamento passivo ou por esfregação ativa, nos seguintes tempos: 30, 60, 120 ou 240 segundos. A análise ao microscópio eletrônico de varredura mostrou que

ambos os ácidos removeram o *smear layer* e promoveram um aumento no diâmetro dos túbulos dentinários, sendo que houve um aumento superior tempo-dependente na profundidade de penetração do ácido cítrico nos túbulos. Nem a aplicação passiva, nem a ativa causaram alterações nas medidas ou na morfologia das superfícies.

Em 1996, Blomlöf et al.²⁰ 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 à 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.

Babay⁷ (1997), por meio de microscopia eletrônica de varredura, constatou que o uso da instrumentação ultrassônica antes e após o condicionamento radicular com solução saturada de ácido cítrico (pH 1) ou com solução saturada de cloridrato de tetraciclina (pH 1.8), por imersão, durante 3 minutos, em dentes sem doença periodontal, promoveu a remoção total de *smear layer*, bem como a exposição de túbulos dentinário e de fibrilas colágenas.

Blomlöf et al.²¹ (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. Baseados 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.⁵², ainda em 1997, analisaram em MEV diferentes modos de aplicação do cloridrato de tetraciclina, em superfícies dentinárias de terceiros molares impactados. A concentração escolhida foi de 50mg/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.

Com o objetivo de avaliar o efeito da concentração e do tempo de aplicação do cloridrato de tetraciclina, Sterrett et al.¹⁰² (1997) realizaram o estudo da aplicação deste ácido em 12 depressões provocadas em 3 molares de bois. As concentrações utilizadas foram: 0, 25, 50, 75, 100, 125 e 150mg/mL. No grupo

controle o condicionamento foi efetuado com ácido cítrico a 30%. Os tempos de aplicação foram de 1, 3 e 5 minutos. Ao final de cada tempo, uma bolinha de algodão foi colocada nas depressões, por 1 minuto, a fim absorver a solução e o cálcio dissolvido. Para a avaliação do grau de desmineralização, os valores foram convertidos em “partes por milhão”, em relação à quantidade de cálcio encontrada em cada bolinha de algodão, por meio de absorção atômica espectromorfológica. Os resultados demonstraram que a aplicação, durante 3 minutos, de cloridrato de tetraciclina à 75mg/mL causou desmineralização tão efetiva quanto maiores concentrações e tempos estudados, sendo que este grau de desmineralização foi bem menor do que o do grupo controle em todos os seus períodos de aplicação.

Em 1999, Lan et al.⁵⁹ 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 à lise de 47% das células; pH 3.8 levou a 90% de morte celular; pH \leq 2.3 levou à 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.

Delazari et al.³³ (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 50mg/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 sangüíneas. 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 limpos, 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 sangüíneos.

No ano de 2000, Zaman et al.¹²¹ avaliaram, quantitativamente, a migração, a adesão e a orientação das células do ligamento periodontal sobre

cimento e dentina provenientes de superfícies radiculares acometidas por doença periodontal, submetidas à raspagem e alisamento radicular seguida de desmineralização com agentes de pH baixo e de pH neutro. Os dentes foram divididos em quatro grupos, de acordo com a solução empregada: 1) solução saturada de ácido cítrico (pH 1.2); 2) EDTA a 24% (pH 7.04); 3) cloridrato de tetraciclina 100mg/mL (pH 2.00); 4) somente raspagem e alisamento radicular (controle). As soluções foram aplicadas nas amostras por meio de imersão, durante 3 minutos. Uma amostra de cada grupo, mas do mesmo dente, foi colocada em meio de cultura contendo células do ligamento periodontal. Após 1, 3 e 7 dias, os autores realizaram a avaliação com microscópio de contraste de fase, observando não haver diferenças na aderência e orientação das células do ligamento periodontal entre cimento e dentina em nenhum dos grupos que sofreram desmineralização. Entretanto, as amostras de dentina tratadas com EDTA e ácido cítrico apresentaram uma maior aderência e orientação celular do que no grupo controle, sendo que o mesmo ocorreu nas amostras de cimento, uma vez que nos três grupos tratados com agentes químicos, os processos de aderência e orientação foram favorecidos. Os autores também destacaram o fato de não haver a necessidade da remoção total de cimento quando for realizado tratamento químico radicular.

Ainda em 2000, Baker et al.¹² 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.

Pilatti⁸² (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 à 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, foi mais efetivo que 1 minuto.

Em 2001, Sampaio⁹² analisou a eficiência do cloridrato de tetraciclina na remoção de *smear layer* sobre a superfície radicular, em diferentes concentrações (10%, 20%, 30%, 40%, 50% e um grupo controle com soro fisiológico), tempos (1, 2 e 3 minutos de aplicação) e modos de aplicação (tópico ou fricção). Analisando as amostras ao microscópio eletrônico de varredura, o

autor concluiu que: I) quanto às concentrações utilizadas, a de 10% mostrou-se superior as outras testadas; II) quanto aos modos de aplicação, todas as concentrações condicionadas com fricção foram superiores àquelas testadas com aplicação tópica; III) quanto aos tempos de aplicação, não houve diferenças significantes, quando se aplicou o cloridrato de tetraciclina de forma tópica, entretanto, observaram-se diferenças significantes nas concentrações de 10% e 20%, quando se usou a fricção; IV) os tratamentos com fricção com a solução à 10% (1 e 2 minutos) e à 20% (1 e 2 minutos) mostraram-se superiores, estatisticamente, aos demais condicionamentos deste estudo.

Babay⁸ (2002) coletou 24 dentes de humanos extraídos em decorrência de periodontite severa e delimitou suas raízes em áreas saudáveis e doentes. Nestas últimas realizou os seguintes tratamentos: raízes não tratadas; raízes raspadas com ultra-som; raízes tratadas com cloridrato de tetraciclina e raízes raspadas com ultra-som seguida da aplicação de cloridrato de tetraciclina. Após o tratamento das raízes, fibroblastos gengivais humanos foram adicionados às mesmas e incubados por 72 horas sendo então examinadas pela microscopia eletrônica de varredura. Houve um número significativamente maior de fibroblastos aderidos às raízes tratadas com ultra-som e com ultra-som seguido da aplicação com cloridrato de tetraciclina. Nas raízes não tratadas e nas raízes apenas condicionadas não foi encontrada nenhuma célula.

No ano de 2003, Abi Rached¹ avaliou, por meio de microscopia eletrônica de varredura, a remoção de *smear layer* e a exposição de fibras colágenas de dentina de superfícies radiculares condicionadas com solução salina

ou com cloridrato de tetraciclina nas concentrações de 10mg/mL, 25mg/mL, 50mg/mL, 75mg/mL, nos tempos de 1, 2 e 3 minutos, utilizando 3 modos de aplicação: tópica, fricção vigorosa e fricção suave. Como conclusão, a autora observou que o TTC HCl na concentração de 50mg/mL, aplicado durante 3 minutos, vigorosamente, obteve os melhores resultados para o objetivo do estudo.

Theodoro¹⁰⁶ (2003), avaliou a adesão de elementos sangüíneos 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, 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, foi depositado tecido sangüíneo em 10 amostras de cada grupo, enquanto as outras 10 amostras não receberam. As fotomicrografias obtidas foram avaliadas por meio de dois índices: adesão de elementos sangüíneos e de morfologia da superfície radicular. Os resultados demonstraram que com relação à adesão de elementos sangüíneos, 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 sangüíneos e o Grupo 2 foi o menos efetivo na adesão de elementos sangüíneos. 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 micro rugosidades na superfície radicular; o EDTA e o laser de Diodo podem inibir a adesão do tecido sangüíneo na superfície radicular apesar de promover uma superfície mais regular.

Em 2004, Sousa⁹⁷ 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 24% (Farmácia Santa Paula); 3) EDTA 24% associado ao detergente Texapon (Farmácia Santa Paula); 4) EDTA 24% (Pref Gel, Biora); 5) EDTA 24% (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.⁹ (2005) avaliaram o efeito de proteínas construtoras na adesão do coágulo sobre a superfície dentinária. Dentes humanos extraídos foram raspados para promoção de *smear layer* e a porção cervical foi cortada em blocos de 4x6x1mm. 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 restos 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.

No ano de 2006, Leite⁶² realizou estudo com o objetivo de avaliar os diferentes padrões de adsorção e adesão de elementos sangüíneos a superfícies radiculares quimicamente condicionadas. Setenta e cinco dentes foram raspados e, equitativamente, divididos em 5 grupos: I) irrigação com água destilada (controle); II) aplicação de solução de ácido cítrico à 25%; III) solução de citrato de sódio a 30%; IV) gel de EDTA a 24% e V) solução de cloridrato de tetraciclina a 50mg/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, segundo o autor, 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.

Estudos in vivo com agentes condicionantes:

Ririe et al.⁸⁷ 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 cimento, os autores citam não ter 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.³¹ (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 2mm, enquanto no grupo onde não foi feita a biomodificação, apenas 43% dos pacientes atingiram essa meta.

Em 1985, Hanes et al.⁴⁶ 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.

Buscando analisar os efeitos da superfície radicular desmineralizada e a aplicação tópica de fibronectina como adjuntas para o sucesso das cirurgias periodontais reconstrutivas, Wikesjö et al.¹¹⁷ (1988) criaram defeitos periodontais horizontais em pré-molares mandibulares de 14 cachorros. Os grupos de dentes randomizados foram divididos nos seguintes tratamentos: 1) raspagem e aplainamento radicular (RAR) e condicionamento com ácido cítrico, por 3 minutos; 2) RAR, condicionamento radicular com ácido cítrico, por 3 minutos e aplicação de fibronectina canina; 3) RAR e condicionamento radicular com cloridrato de tetraciclina à 100mg/mL, por 5 minutos; 4) RAR, condicionamento radicular com cloridrato de tetraciclina à 100mg/mL, por 5 minutos e aplicação de fibronectina canina. Após 12 semanas foi realizado o sacrifício dos animais e a

análise histométrica permitiu a verificação: a) da incidência de defeitos que apresentaram uma linha de tecido epitelial; b) da quantificação de reparo de tecido conjuntivo; c) da regeneração de osso alveolar; d) da incidência de reabsorção óssea; e) da presença ou não de anquilose. Como conclusão geral, os autores puderam observar que: I) o condicionamento com ácido cítrico na superfície radicular, freqüentemente, resultou em um completo reparo do tecido conjuntivo; II) reabsorção radicular e anquilose foram fatores prevalentes na resposta de cicatrização; III) o ácido cítrico e o cloridrato de tetraciclina tiveram potencial similar na indução de reparo de tecido conjuntivo nos casos em que houve reabsorção radicular e anquilose; d) a aplicação de fibronectina às raízes desmineralizadas não aumentou a incidência de reparo do tecido conjuntivo, bem como não alterou a prevalência de casos com reabsorção radicular e anquilose.

Em 1990, Alger et al.³ realizaram cirurgia mucogengival em 22 dentes com doença periodontal, divididos em 3 grupos: 1) grupo tratado com raspagem e alisamento radicular; 2) grupo submetido ao condicionamento radicular com cloridrato de tetraciclina 100mg/mL, por 3 minutos; 3) grupo submetido ao condicionamento radicular com cloridrato de tetraciclina 100mg/mL, por 3 minutos e com fibronectina humana 10mg/mL, por 5 minutos. Após 90 dias, foi realizada a extração de blocos contendo dente, gengiva, osso alveolar e ligamento periodontal, com o intuito de observar, histologicamente, a utilização dos métodos testados em relação à reinserção gengival nas raízes tratadas. Os autores puderam observar que os grupos tratados com cloridrato de tetraciclina (2 e 3) sofreram pequena reinserção e que houve uma tendência de

aumento de inserção de tecido conjuntivo no grupo tratado somente com cloridrato de tetraciclina.

Trombelli, Calura¹⁰⁸ (1993) realizaram uma técnica cirúrgica buscando a regeneração tecidual guiada, com o intuito de recobrimento de raízes expostas devido à recessão gengival. Para isto, utilizaram uma membrana de politetrafluoretileno (e-PTFE) associada ao tratamento radicular com cloridrato de tetraciclina em concentração de 125mg/mL. Após 6 semanas, a membrana foi removida e constatou-se a presença de um tecido firme e resistente à sondagem em dois pacientes submetidos a esta técnica. Os autores concluíram que a associação da membrana ao cloridrato de tetraciclina resultou em um eficiente recobrimento radicular e no desaparecimento do defeito anatômico presente.

Após cinco anos de avaliação clínica, McClain, Schallhorn⁷⁴ (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.

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 inicial¹¹¹.

Em 1994, Sammons et al.⁹⁰ 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.

Para avaliar a possibilidade de necrose dos tecidos periodontais, adjacentes a superfícies radiculares biomodificadas, por agentes de baixo pH ou pH neutro, Blomlöf, Lindskog¹⁸ (1995) 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 ¼ 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, Lindskog¹⁹ (1995) 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, agindo por 3 minutos, não causa necrose nos tecidos adjacentes, pois atua em pH neutro.

No ano de 1997, Bouchard et al.²³ analisaram 30 pacientes, com idades entre 21 e 70 anos, que procuraram consultório particular devido à presença de sensibilidade dentária e recessão gengival. Os dentes escolhidos para a pesquisa foram incisivos, caninos e pré-molares, sendo distribuídos nos seguintes grupos de tratamento: a) Cirurgia subepitelial modificada, seguida por condicionamento radicular com ácido cítrico, pH 1.0, por 3 minutos (grupo controle) e b) Cirurgia subepitelial modificada, seguida por condicionamento radicular com cloridrato de tetraciclina 50mg/mL, por 5 minutos. A avaliação dos dados foi realizada no baseline e após 6 meses da cirurgia. Os autores puderam observar que não houve diferenças no potencial dos efeitos clínicos causados pelo

ácido cítrico ou pelo cloridrato de tetraciclina associados à técnica cirúrgica, sendo que, na verdade, os dados apresentados sugeriram que as medidas da área das superfícies com recessão seriam mais significativas para se avaliar o sucesso da terapia cirúrgica empregada.

Em 1998, Mayfield et al.⁷² 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).

Kassab, Cohen⁵⁵ realizaram, em 2003, uma revisão de literatura a respeito da atuação de agentes condicionantes na biomodificação radicular. Dentro desta análise, puderam observar que vários estudos ainda devem ser realizados com agentes de baixos pHs, como o ácido cítrico e a tetraciclina e com agentes de pH neutro, como o EDTA, uma vez que a remoção de *smear layer*, in vitro, e a exposição de fibras colágenas não conseguiram mostrar resultados satisfatórios na cicatrização da ferida periodontal, quando os mesmos agentes foram utilizados in vivo. Mesmo assim, como conclusão, os autores sugerem que o EDTA não causa necrose tecidual, enquanto que os agentes de baixo pH podem levar a tal situação.

Chandra et al.²⁶ (2006) verificaram a adesão e morfologia de células V79 (fibroblasto pulmonar de hamster) e de fibroblastos de ligamento

periodontal humano sobre superfícies dentinárias, oriundas de dentes com periodontite, submetidas a condicionamento com EDTA 24%, ácido cítrico pH 1.0 e TTC HCL 10%. Os resultados mostraram que o comportamento dos dois tipos celulares foi semelhante e que no grupo tratado com cloridrato de tetraciclina havia remanescentes de *smear layer* sem exposição de fibras colágenas. Os demais grupos não apresentaram remanescentes de *smear layer* e apresentaram maior extensão de exposição do colágeno dentinário.

Estudos com Plasma Rico em Plaquetas (PRP):

As plaquetas são fragmentos do citoplasma megacariócito que, por sua vez, originam-se na medula óssea. Elas possuem um aparato de síntese de proteína rudimentar, portanto, sua função é o armazenamento e transporte de fatores de crescimento e de fatores de coagulação nela existentes, os quais são liberados quando as plaquetas são expostas a agentes como trombina, colágeno e ADP. Conseqüentemente, a liberação desses mitógenos requer uma contínua liberação de novas plaquetas^{47,112,120}.

O estudo de Gray, Elves⁴⁴ (1982) propiciou um avanço muito grande no que diz respeito à aplicação de fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), quando apresentaram em seus resultados que o PDGF contribuía para a angiogênese necessária ao sucesso dos enxertos ósseos. Hoje em dia, sabe-se que os fatores de crescimento no processo de reparação tecidual

exercem papel fundamental e efetivo na proliferação celular, angiogênese, diferenciação e síntese de matriz extracelular, bem como na quimiotaxia⁴.

Healy, Egan⁴⁸, em 1984, em estudo clínico após avaliação de 21 pacientes, sendo 12 utilizados como teste e 9 como controle, realizaram uma coleta de sangue venoso, padronizada matinalmente (às oito horas e trinta minutos). Avaliaram a ação do citrato na concentração de uma parte de citrato trissódico a 3.8% para nove partes de sangue e o outro anticoagulante foi o EDTA em concentração de 1.5mg/mL de sangue. A centrifugação foi realizada a 50g, 100g ou 150g por 10 minutos em temperatura de 20°C. Para revelar a adesividade do PRP foi utilizado o agente receptor 5 hidroxí-triptamina (5 HT). Os autores obtiveram melhores resultados com o uso de EDTA, refletindo a maior habilidade para inibir o aglomerado de plaquetas. Chegaram à conclusão que o método de centrifugação e o tipo do anticoagulante utilizado promoviam diferentes resultados no PRP obtido, inclusive proporcionando variações no número, tamanho e reatividade das plaquetas.

Lynch et al.⁶⁴, em 1989 avaliaram, por meio de estudo experimental em três cães, a ação sinérgica da associação do PDGF e do fator de crescimento semelhante à insulina – I (IGF -I), na concentração de 1.0µg em solução aquosa gel para regeneração periodontal. Previamente, os cães receberam tratamento periodontal com instrumentos sônicos para controle de tártaro e do biofilme. Utilizaram em cinco dentes o gel combinado e, em sete dentes, gel placebo. Foram tomadas radiografias iniciais e realizada a elevação de retalho mucoperiosteal para aplicação dos respectivos géis. Após duas semanas, as regiões

foram submetidas à biópsia e posteriormente à avaliação histológica. Obtiveram resultados melhores na regeneração periodontal dos dentes tratados com o gel da associação dos fatores de crescimento em comparação ao grupo controle.

Whitman et al.¹¹⁵ (1997) descreveram o gel de plaquetas como um selante biológico, derivado da coleta de sangue autólogo imediatamente no período pré-operatório, contendo alta concentração de plaquetas. Destacam ainda sua aplicação clínica em cirurgia maxilo-facial, reconstrução mandibular e procedimentos relacionados à colocação de implantes osseointegráveis onde obtém bons resultados quando associado à enxerto ósseo autólogo. Também descreve utilização com aparente sucesso em uma variedade de aplicações em outras áreas como a neurocirurgia, otorrinolaringologia, cirurgia geral e cirurgia da cabeça e pescoço.

Carlson²⁴ (2000) afirma que o uso do plasma rico em plaquetas (PRP) é uma estratégia para alcançar a reparação tecidual. É efetivada pelos fatores de crescimento liberados pela ação plaquetária: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de transformação beta (TGF- β), fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I). O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) está envolvido na reparação tecidual, pelo papel duplo das plaquetas como reserva de fator de crescimento e na hemostasia. O PDGF apresenta numerosos efeitos positivos na reparação tecidual incluindo a mitogênese, causando um aumento no número de células de reparação, a angiogênese e promovendo efeitos sobre outros fatores de crescimento de células. Dessa forma, resulta na promoção de funções fibroblásticas e osteoblásticas,

promoção de diferenciação celular e aceleração dos efeitos dos fatores de crescimento sobre outras células, tais como macrófagos. O PDGF é uma glicoproteína sintetizada e secretada pelos macrófagos e células endoteliais e é o primeiro fator de crescimento. Os efeitos do PDGF ocorrem quando ele se liga nos receptores da membrana celular. Esta ligação ativa um sinal citoplasmático protéico interno que ativa o gene que expressa ação mitótica e angiogênica. O fator de crescimento de transformação beta (TGF- β) é envolvido com a reparação de tecido conjuntivo e reparação óssea. Quando liberado pela degranulação das plaquetas ou secretado por macrófagos, TGF- β exerce seu efeito nas células adjacentes, que incluem fibroblastos, células indiferenciadas na medula e pré-osteoblastos. A mais importante função do TGF- β no tecido ósseo parece ser a quimiotaxia e mitogênese dos osteoblastos precursores e a capacidade de estimular seu depósito de matriz de colágeno para reparação com tecido conjuntivo e formação óssea. Os fatores de crescimento semelhante à insulina I - IGF-I e IGF-II são secretados pelos osteoblastos. Durante a formação óssea promovem um aumento do número de osteoblastos e conseqüentemente aceleram a deposição óssea. Supõe-se que a presença do IGF nas plaquetas possa atuar nas células precursoras de osteoblastos e nos osteoblastos do endóstio.

Marx⁶⁹ (2001) apresentou à comunidade científica considerações importantes relacionadas ao plasma rico em plaquetas, que age como uma porta para estimulação e aceleração da cicatrização de tecidos moles e reparação óssea. Mas, devido a este potencial, muitos profissionais cometem erros, abusos e aplicação incorreta do PRP. Para o resultado adequado do PRP, segundo o autor,

deve-se obter uma concentração de 1.000.000 plaquetas/ μ L em 5.0ml de plasma. Pelo fato de ser um procedimento autógeno o paciente está livre de transmissão de doenças infecto-contagiosas. O autor destaca ainda, a presença de sete fatores de crescimento no PRP: fator de crescimento derivado de plaquetas aa (PDGF AA), PDGF BB, PDGF AB, fator de crescimento de transformação β_1 (TGF β_1), TGF β_2 , fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento epitelial (EGF) sendo estes considerados nativos e não recombinantes. O autor também destaca que o PRP não apresenta ação osteoindutora, que é efetiva nas proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), mas que acelera a atividade osteogênica. Além disso, o PRP deve ser preparado no momento de ser utilizado, pois, dez minutos após sua preparação ocorre a liberação de 70% dos fatores de crescimento e ao final de uma hora 100%, sendo que sua ação no sítio cirúrgico pode estender-se por oito dias. O PRP não é carcinogênico, nem mutagênico, pois atua nas membranas celulares e não no núcleo celular e promove expressão gênica normal. O uso do PRP é considerado uma nova biotecnologia na odontologia e pode atuar na engenharia tecidual e celular.

Com relação ao uso do PRP em tecidos moles, Petrunaro⁸¹ (2001) apresentou o relato de 3 casos clínicos de pacientes que necessitavam de cirurgias mucogengivais para recobrimento de recessões múltiplas. A técnica mucogengival usada foi a de enxerto de tecido conjuntivo sub-epitelial, e o mesmo protocolo foi adotado nos 3 casos. Após a obtenção do enxerto do palato, o mesmo foi impregnado com o PRP, o leito receptor também foi tratado com PRP, o enxerto foi colocado em posição e suturado. Realizou-se a sutura do leito receptor e, sobre

esta linha de sutura, aplicou-se o restante do PRP e do plasma pobre em plaquetas (PPP). Em todos os casos houve recobrimento total das recessões e aumento da espessura da mucosa ceratinizada. O autor concluiu que o PRP trouxe benefícios à técnica, tais como: menor sangramento no leito receptor devido a suas propriedades hemostáticas, menor dor pós-operatória devido à maturação mais rápida do enxerto, estabilidade inicial do enxerto devido a suas propriedades adesivas, além de promover uma revascularização mais rápida.

Sánchez et al.⁹³ (2003) publicaram uma revisão da literatura sobre os fatores de crescimento (FC) presentes no PRP reafirmando suas propriedades biológicas e o papel do PRP no processo de reparo. Com esta revisão, concluíram que: o FC, quando ativado, libera os grânulos α plaquetários; os FC liberados pelas plaquetas induzem as células mesenquimais e epiteliais a migrarem, dividirem-se e aumentar a formação de matriz colágena; o PRP sendo autógeno elimina a possibilidade de transmissão de doenças; o PRP melhora o manuseio de enxertos; quando associado ao osso autógeno, o PRP parece melhorar a quantidade e qualidade do osso formado; deve-se evitar a ativação do PRP com trombina para evitar o desenvolvimento de coagulopatias; avanços tecnológicos permitem a obtenção do PRP com menor volume de sangue coletado; estudos longitudinais são necessários para avaliar a associação do PRP com biomateriais nos processos de regeneração óssea guiada (ROG).

Marx⁷⁰, em 2004, em revisão de literatura sobre o uso do PRP, direcionada para evidências que suportem seu uso, destaca o seguinte: O PRP não é apenas um concentrado de plaquetas com seus fatores de crescimento, mas

também contém três proteínas sangüíneas que são: fibrina, fibronectina, vitronectina. Estas proteínas são responsáveis pela adesão celular para osteoindução e agem como matriz para osso, tecido conjuntivo e migração epitelial. O uso de centrífugas em consultório deve promover a obtenção de material estéril e uma precisa separação das plaquetas das células sangüíneas vermelhas, sem que ocorra a degranulação plaquetária. Em algumas centrífugas de uso odontológico não se obtém o PRP conforme descrito acima, ocasionando resultados indesejados. O procedimento de obtenção de plaquetas deve ser autógeno e não homogêneo, pois plaquetas de banco de sangue podem produzir resultados indesejados. As duas centrífugas certificadas pela *Food and Drug Administration (FDA)* foram a *Smart PreP – Harvest Technologies Inc e Platelet concentration collection system – PCCS*, com obtenção de concentrado de plaquetas adequados. As células mesenquimais, epidermais, epiteliais, fibroblastos e osteoblastos expressam receptores de membrana para os fatores de crescimento do PRP, que por sua vez estimulam a ativação de proteínas endógenas, que promovem uma sucessão gênica normal e induzem à proliferação celular, formação de matriz, síntese de colágeno, formação óssea etc. Após a ação inicial dos fatores de crescimento, que pode permanecer de 7 a 10 dias, ocorre a ação dos macrófagos dentro da ferida, consumindo as plaquetas exauridas. O PRP tem um pH de (6.5 a 6.7), comparado com um coágulo sangüíneo maduro de (7.0 a 7.2).

PROPOSIÇÃO

Proposição

Este estudo tem por objetivo avaliar, por meio de microscopia eletrônica de varredura, a remoção de *smear layer* e exposição de fibras colágenas de dentina e o grau de adsorção e adesão de plasma rico em plaquetas e de células sangüíneas a superfícies radiculares raspadas, aplainadas e associadas ou não ao uso de diferentes agentes químicos.

MATERIAL E MÉTODO

MATERIAL E MÉTODO

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

Seleção dos dentes

Foram utilizados 80 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 comprometimento 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 ser fumante ou ex-fumante, 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^{17,32,107,110,122}.

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, trocada semanalmente, a fim de evitar acidificação do meio e crescimento exacerbado de microrganismos. Para evitar ressecamento, cada dente (Figura 1) foi mantido em temperatura ambiente, em tubo plástico individual fechado (Eppendorf, New England, USA).



FIGURA 1- Dente em *eppendorf* com água, após extração.

O terço cervical mesial e distal das raízes foi delimitado por dois sulcos paralelos, confeccionados com auxílio de broca cilindro-cônica diamantada (nº 3203, KG Sorensen, Barueri, SP), um na junção cimento-esmalte e outro, aproximadamente, 4mm do mesmo, em direção apical (Figura 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), para garantir a formação de *smear layer*^{1,14,97,106} (Figura 3). A seguir, com auxílio de um disco diamantado montado em baixa rotação (KG Sorensen, Barueri, SP), a partir de 1mm apical à junção cimento-esmalte (Figura 4), foi obtido um fragmento das superfícies radiculares mesial e distal, medindo, aproximadamente, 1mm de espessura, 4mm de largura e 4mm de comprimento cada, a fim de que houvesse a totalização de 2 amostras por dente (Figura 5), ficando mantidas no mesmo frasco até o dia do tratamento das superfícies.

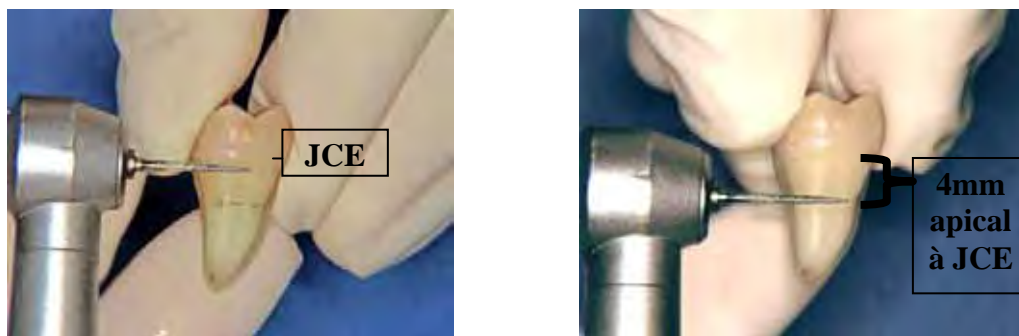


FIGURA 2- Marcação dos sulcos para delimitação do local para raspagem e



FIGURA 3- Formação de *smear layer*.



FIGURAS 4 e 5 - Disco diamantado em baixa rotação e obtenção das duas amostras, respectivamente.

Todas as amostras sofreram condicionamento com agentes químicos ou com soro fisiológico, sendo que metade delas serviu para que se observasse a capacidade de cada tratamento em expor ou não fibras colágenas, ficando cada grupo (n=16) em suporte plástico (cassete) devidamente codificado (Figura 6).

Cera utilidade foi colocada dentro de outros cassetes a fim de que a metade restante se mantivesse em posição (Figura 7) durante a realização dos tratamentos associados à aplicação de PRP (n=8) e de PRP + sangue (n=8).



FIGURA 6 - Cassetes codificados com cada grupo de amostras.

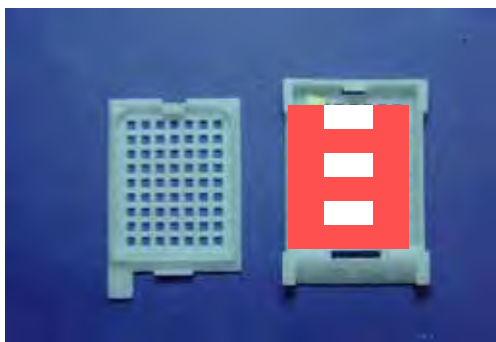


FIGURA 7- Esquema de amostras dentro de cassete com cera.

As seguintes substâncias foram aplicadas sobre todas as amostras (32 dentes/grupo – Figura 8):

- **Grupo I** – amostras que receberam irrigação com 10mL 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^{21,97}.

- **Grupo III** – amostras que receberam tratamento com ácido cítrico 25% (Farmácia Santa Paula, São Paulo, Brasil), aplicado topicamente com auxílio de bolinhas de algodão, umedecidas a cada 30 segundos na solução, durante 3 minutos^{100,101}.

- **Grupo IV** – amostras que receberam tratamento com solução de cloridrato de tetraciclina (Farmácia Santa Paula, Araraquara, São Paulo, Brasil), na concentração de 50mg/mL, aplicada vigorosamente por fricção, com auxílio de bolinhas de algodão, umedecidas na solução a cada 30 segundos, durante 3 minutos^{1,51,53}.

- **Grupo V** – amostras que 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^{100,101}.

Após o condicionamento das superfícies, as amostras dos grupos II ao V foram irrigadas com 10mL de solução fisiológica para remoção dos agentes utilizados.



FIGURA 8- Modos de aplicação das substâncias.

Visualização das fibras colágenas

Para verificar a ocorrência da biomodificação radicular, isto é, se havia ocorrido remoção de *smear layer* e exposição de fibras colágenas, uma das duas amostras obtidas de cada dente, ou seja, aquela que só tinha sido condicionada com as substâncias descritas, foi colocada em orifício individual de uma placa de acrílico contendo 96 poços, sendo submetidas à desidratação em série crescente de álcool etílico (30%, 50%, 70%, 80%, 95%, 100%),

permanecendo submersas por uma hora em cada (Figura 9). 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 (Figura 10).

Assim, cada orifício da placa de acrílico recebeu 0.75 μ L de HMDS + 0.75 μ L de álcool absoluto, medidos com pipeta automática, onde as amostras, devidamente codificadas, permaneceram por 30 minutos (Boeco, Hamburg, Germany). Depois de decorrido esse tempo, a solução foi retirada e os poços foram preenchidos com 1mL de HMDS puro, que ficou agindo por 10 minutos. Toda a manipulação do HMDS foi realizada em capela com ventilação acionada, em função de o produto ser tóxico e dotado de propriedades cancerígenas.

Finalizada a aplicação do HMDS, cada amostra foi armazenada em cassete individual forrado com papel filtro (Figura 11), no intuito de absorção completa do produto utilizado. Todos os cassetes permaneceram, durante 48 horas, dentro de placas de Petri fechadas para secagem. Em seguida, as amostras foram coladas em *stubs* metálicos, levadas a um dessecador a vácuo (Figura 12), receberam metalização com ouro (Figura 13) e submetidas à avaliação em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

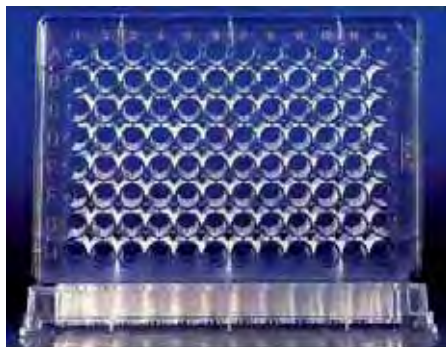


FIGURA 9- Placa de acrílico com 96 poços.



FIGURAS 10 e 11- HMDS e cassetes individuais forrados com papel filtro, respectivamente.



FIGURAS 12 e 13- Dessecador a vácuo e amostra metalizada, respectivamente.

Análise das células sanguíneas e rede de fibrina

Para o processamento a seguir, cada grupo ficou dividido da seguinte maneira após o condicionamento radicular: 8 amostras receberam aplicação de PRP, enquanto as outras 8 amostras receberam PRP e sangue.

a) Aplicação de Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

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, foram coletados 4.5mL de sangue da circulação periférica de um paciente jovem (Figura 14), cujo termo de consentimento livre e esclarecido foi devidamente preenchido, lido, compreendido e assinado (Anexo 3), 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. Anexo 4) por meio de um tubo (Vacutainer, BD Becton, Dickinson and Company; Franklin Lakes, NJ, USA), contendo o anticoagulante citrato de sódio a 3,2% em 10% do volume total (Figura 15).



FIGURAS 14 e 15- Coleta do sangue para preparo do PRP e sangue em tubo com anticoagulante, respectivamente.

De acordo com protocolo proposto por Martins⁶⁷, em 2003, o tubo foi centrifugado (Figuras 16 e 17) a 1.100 r.p.m. durante 10 minutos (Centrífuga Eppendorf 5702, Becton Dickinson, Germany). Após esta centrifugação o mesmo apresentou-se com duas partes visualmente distintas: série vermelha ao fundo e série branca acima. Estas séries ficaram separadas por uma tênue nuvem de leucócitos (Figura 18).



FIGURAS 16 e 17- Centrífuga e local para centrifugação do tubo com sangue, respectivamente.

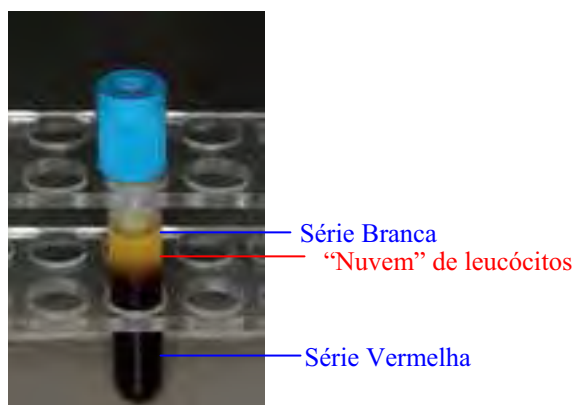


FIGURA 18- Separação das séries branca e vermelha por “nuvem” de leucócitos.

A série branca ficou dividida em 3 partes: plasma rico em plaquetas (PRP), plasma com fator de crescimento (PFC) e plasma pobre em plaquetas (PPP - Figura 19).



FIGURA 19- Esquema das séries vermelha e branca após centrifugação e das frações da série branca.

Em seguida foi realizada a pipetagem metódica das frações do plasma, evitando-se turbulências no tubo de coleta, por meio de pipetas de volume variável (Biohit Proline Pipettor 100-1000 μ L, Helsinki, Finland), sendo que a parte utilizada no presente estudo foi somente a do PRP. Para garantir que apenas o PRP seria utilizado, padronizou-se o volume a ser coletado em 500 μ L, o qual foi transferido para um tubo de coleta neutro (Figura 20). A seguir, o PRP foi ativado com cloreto de cálcio (CaCl) a 10%, na proporção de 1.0mL de PRP/50 μ L de CaCl. Após 15 a 20 minutos foi obtido o gel do plasma rico em plaquetas.



FIGURA 20- Pipetagem do PRP.

A contagem do número de plaquetas inicial (no sangue total) e final (PRP) foi realizada em aparelho eletrônico (Coulter T890, Diamond Diagnostics, USA).

PRP foi aplicado em todas as amostras de cada dente com pincel macio, a fim de que fosse depositada somente uma fina camada deste material, uma vez que, conforme citado, 8 delas ainda receberiam uma gota de sangue.

b) Aplicação do Plasma Rico em Plaquetas e do Sangue

Imediatamente após o pincelamento de PRP sobre as 8 amostras restantes de cada grupo foi depositada uma gota de sangue fresco. A retirada do mesmo e a realização dos exames de coagulação também ocorreram 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. Este foi coletado da circulação periférica do mesmo paciente (Figura 21), por meio de uma seringa de 5mL e agulha hipodérmica (Becton Dickinson, New Jersey, USA).

O sangue foi depositado, com auxílio de seringa hipodérmica (1 gota por amostra) nos espécimes previamente pincelados com PRP (Figura 22), seguindo-se o protocolo estabelecido por Baker et al.¹² (2000), mantendo-os imóveis por 20 minutos para garantir sua estabilização, sem ressecamento, em câmara plástica umidificadora. Todo o procedimento foi realizado em ambiente fechado, sob temperatura de 37°C^{38,79,114}.



FIGURAS 21 e 22- Nova retirada de sangue seguida de aplicação de uma gota por amostra, respectivamente.

Em seguida, todas as amostras foram lavadas 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, nos cassetes plásticos contendo os grupos estabelecidos, os espécimes foram fixados 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 incubados por 10 minutos em 0,02M de glicina em solução de tampão fosfatado e lavados novamente por 3 vezes, durante 5 minutos. A seguir, foram fixados em glutaraldeído a 2,5% em solução de tampão fosfatado durante 30 minutos e lavados como descrito anteriormente. Na seqüência, as amostras foram desidratadas em série crescente de álcool 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). 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 Tratamento	Controle	EDTA	Ácido citríco	TTC HCl	Citrato de sódio	Total
HMDS	16	16	16	15	16	79
PRP	8	8	8	8	8	40
PRP + Sangue	8	8	8	8	8	40
Total	32	32	32	31	32	159

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 (Figuras 12 e 13). 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 obteve-se fotomicrografias com auxílio de filme Neopan Acros (Fuji Film 120 SS, Tokyo, Japan).

Nas amostras onde foi aplicado somente o HMDS ou o PRP, as fotomicrografias foram obtidas no aumento de 2000X, já naquelas onde foram

aplicados o PRP e o sangue, os aumentos utilizados foram de 500x e de 1000X. Para padronização deste estudo, as análises ao microscópio foram realizadas na área central de cada amostra.

Análise das fotomicrografias

As fotomicrografias foram analisadas por 1 examinador previamente calibrado, treinado e sem conhecimento quanto à identificação das amostras^{1,14,62,82,91,97,106}.

Para as amostras que foram apenas condicionadas e que receberam a impregnação do HMDS, o examinador realizou a descrição morfológica da superfície, por meio do Índice de Biomodificação Radicular (IBR)⁶², que observa o seguinte (Figuras 23 a 25 – Anexo 5):

- (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*.

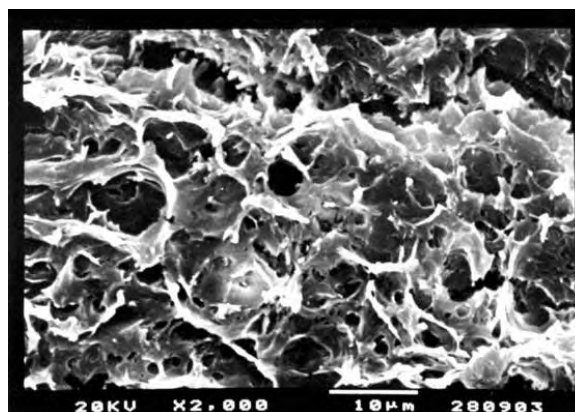


FIGURA 23- Índice de Biomodificação Radicular 1.

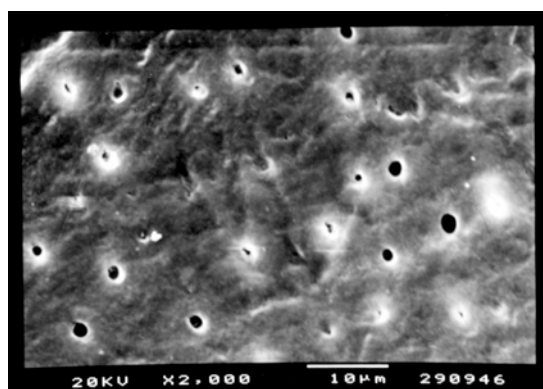


FIGURA 24- Índice de Biomodificação Radicular 2.

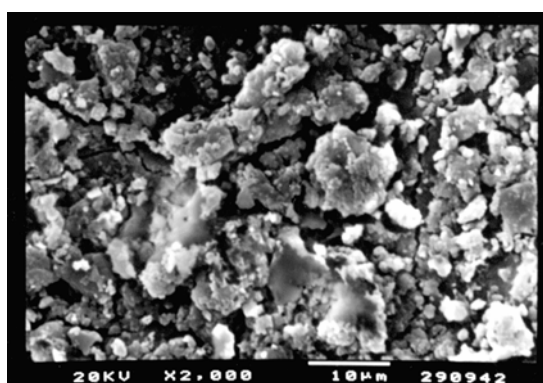


FIGURA 25- Índice de Biomodificação Radicular 3

Para a análise das fotomicrografias das amostras que receberam somente o PRP, foi utilizada a letra "S" para presença e a letra "N" para ausência da rede de fibrina (quando somente era visualizado o cimento ou dentina ao microscópio eletrônico de varredura – Figuras 26 e 27, respectivamente - Anexo 6).

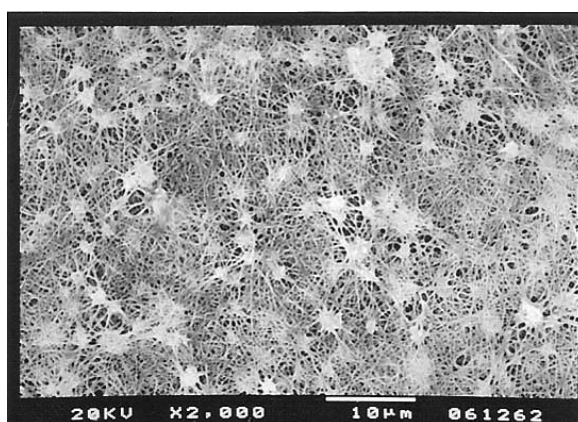


FIGURA 26- Presença da rede de fibrina.

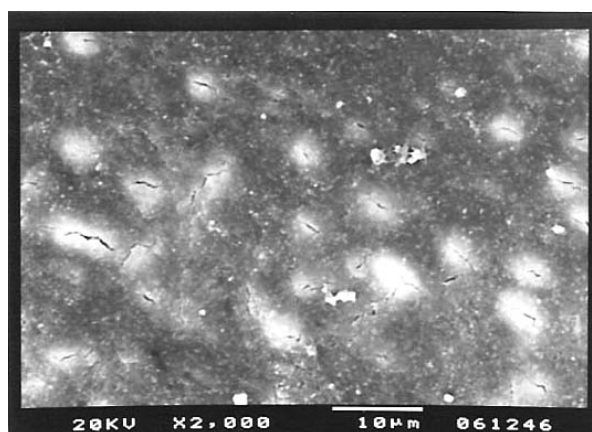


FIGURA 27- Ausência da rede de fibrina. Visualização de cimento e/ou dentina.

Para a análise das fotomicrografias que receberam o PRP seguido de aplicação de sangue, foi utilizado um Índice de Adesão de Elementos Sangüíneos (IAES)¹⁰⁶, descrito a seguir (Figuras de 28 a 31 – Anexo 7):

- (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.

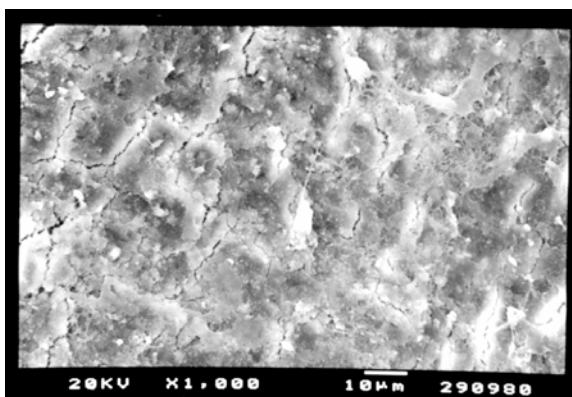


FIGURA 28- Índice de Adesão de Elementos Sangüíneos 0.

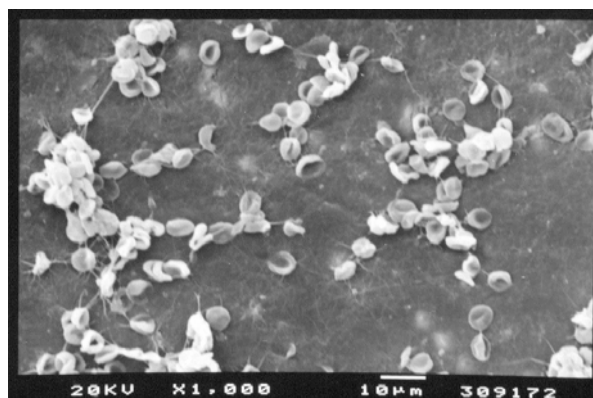


FIGURA 29- Índice de Adesão de Elementos Sangüíneos 1.

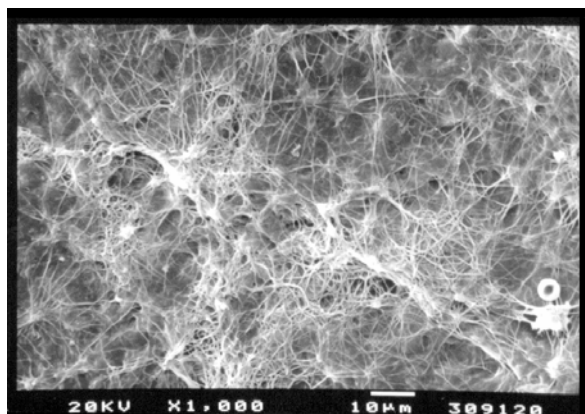


FIGURA 30- Índice de Adesão de Elementos Sangüíneos 2.

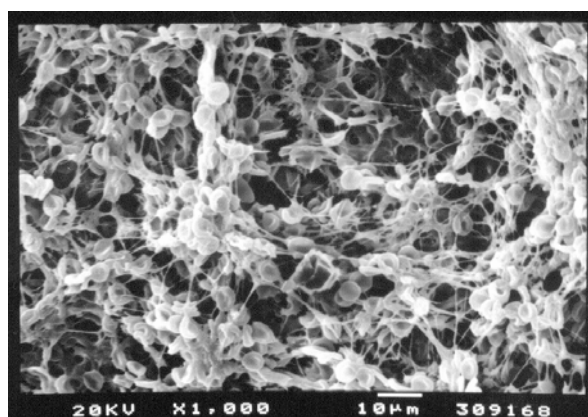


FIGURA 31- Índice de Adesão de Elementos Sangüíneos 3.

Para cada fotomicrografia, o examinador realizou 3 leituras com intervalo mínimo de 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 (Anexos 5 e 7). A análise de concordância intra-examinador foi realizada por meio de teste Kappa, ao nível de significância de 5%.

As variáveis ordinais dependentes “Índice de Adesão de Elementos Sangüíneos” (IAES) e “Índice de Biomodificação Radicular” (IBR) foram avaliadas segundo os grupos experimentais, empregando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, adotando-se como nível de significância o valor de 0,05. 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.

RESULTADO

RESULTADO

Planejamento estatístico

Nos objetivos e na metodologia deste trabalho, três questões sobressaem-se:

1. As leituras das fotomicrografias intra-examinador apresentaram concordância quando foram avaliados os graus do “Índice de Adesão de Elementos Sangüíneos” (IAES)? E quanto aos graus do “Índice de Biomodificação Radicular” (IBR)?
2. Os tratamentos, a saber: soro fisiológico; gel de EDTA 24%; ácido cítrico 25%; solução de cloridrato de tetraciclina 50mg/mL e solução de citrato de sódio a 30%, exerceram efeitos iguais sobre o “Índice de Adesão de Elementos Sangüíneos”?
3. Os tratamentos exerceram efeitos iguais sobre o “Índice de Biomodificação Radicular”?

Os dois questionamentos explícitos no item 1 inferem as hipóteses de que “as leituras não tiveram concordância entre si” na avaliação dos graus do IAES (ou do IBR), contra a de que “as leituras apresentaram concordância entre si” na avaliação dos graus do IAES (ou do IBR). Essas hipóteses foram verificadas no nível de significância de 0,05 com o auxílio da estatística Kappa (k) e, como o quociente entre a estimativa da estatística k e o desvio padrão dessa estimativa apresenta uma distribuição de probabilidades aproximada da normal

reduzida (Z), a regra de decisão foi definida com o auxílio de $p=P(Z > Z_0)$ — probabilidade de que a estatística norma reduzida Z seja maior do que seu valor observado (Z_0) nos dados da amostra — do modo que se segue: se $p > 0,05$, o valor Z_0 foi não significante e a hipótese sob teste foi não rejeitada (ou admitida) e, em caso contrário, se $p \leq 0,05$, o valor Z_0 foi significante e a hipótese sob teste foi rejeitada (ou não admitida).

As hipóteses relativas aos itens 2 e 3 foram verificadas com o auxílio do teste de Kruskal-Wallis, simbolizado por H , no nível de significância de 0,05 sendo que a regra de decisão foi definida a partir de $p=P(H > H_0)$ — probabilidade de que a estatística H seja maior do que seu valor observado (H_0) nos dados da amostra — do modo que se segue: se $p > 0,05$, o valor H_0 foi não significante e a hipótese sob teste foi não rejeitada (ou admitida) e, em caso contrário, se $p \leq 0,05$, o valor H_0 foi significante e a hipótese sob teste foi rejeitada (ou não admitida).

No caso de o teste de Kruskal-Wallis determinar a rejeição de uma das hipóteses, será necessário aplicar testes adicionais para se identificar o tratamento que está condicionando efeito diferente sobre o índice estudado. Como foram cinco os tratamentos introduzidos nesta pesquisa, será usado o teste de Kruskal-Wallis como teste adicional se mais do que dois tratamentos forem mencionados e o teste de Mann-Whitney se dois tratamentos forem mencionados. Em relação ao teste de Mann-Whitney, se a frequência dos tratamentos for maior do que 10 deve-se usar a aproximação norma reduzida Z .

Análise Estatística

Aplicando-se a estatística k aos dados obtidos experimentalmente, obteve-se a Tabela 2.

Tabela 2- Frequência, estimativa para k, desvios padrão da estimativa e p segundo índices.

Índice	Frequência	Estimativa	Desvio Padrão	Valor de Z_0	Valor de p
IAES	40	0,810	0,056	14,464 (s)	0,0001
IBR	79	0,949	0,075	12,653 (s)	0,0001

s = valor significante.

Na Tabela 2, observou-se o valor $k=0,810$ para o IAES e $0,949$ para o IBR, que derivaram os valores $Z_0=14,464$ e $Z_0=12,653$, respectivamente, sendo que ambos esses valores observados para Z foram significantes porque $p<0,05$. Assim, a amostra evidenciou subsídios para se rejeitar a hipótese de que as leituras das amostras não apresentaram concordância ao atribuírem os graus tanto para o IAES quanto para o IBR.

Como as 3 leituras (Anexo 7) apresentaram concordância em relação aos graus da variável dependente IAES, atribuiu-se para os seus valores de análise o grau que correspondeu à frequência comum a pelo menos duas das leituras, para a análise da hipótese de que os tratamentos tenham induzido iguais

efeitos sobre ela. A aplicação do modelo estatístico de Kruskal-Wallis aos dados desse índice forneceu a Tabela 3.

Tabela 3- Freqüência, postos médios e classificação segundo tratamento, em relação ao IAES.

Tratamento	Freqüência	Posto Médio	Classificação
Controle	8	19,06	A
EDTA 24%	8	15,38	A
Ácido Cítrico 25%	8	23,50	A
TTC HCl	8	19,44	A
Citrato de Sódio 30%	8	25,13	A

Na Tabela 3, observou-se que os postos médios relativos a cada um dos tratamentos pertencem ao mesmo conjunto A, isto é, eles foram estatisticamente iguais entre si. De fato, obteve-se o valor de $H_0=3,786$ para a estimativa da estatística de Kruskal-Wallis, que foi não significativa porque a esse valor se correspondeu um $p=0,436$ na distribuição de quiquadrado (χ^2) com quatro graus de liberdade. Assim, houve evidência amostral para não se rejeitar, ou seja, admitir a hipótese de que os tratamentos tenham induzido iguais efeitos sobre o grau do IAES.

Como as 3 leituras também apresentaram concordância em relação aos graus da variável dependente IBR (Anexo 5), atribuiu-se para os seus valores de análise o grau que correspondeu à frequência comum em pelo menos duas das leituras, para a análise da hipótese de que os tratamentos tenham induzido iguais efeitos sobre ela. A aplicação do modelo estatístico de Kruskal-Wallis aos dados desse índice forneceu a Tabela 4.

Tabela 4- Frequência, postos médios e classificação segundo tratamento, em relação ao IBR.

Tratamento	Frequência	Posto Médio	Classificação
Controle	16	67,00	C
EDTA 24%	16	28,63	A
Ácido Cítrico 25%	16	18,80	A
TTC HCl	15	36,50	B
Citrato de Sódio 30%	16	36,50	B

Na Tabela 4, observou-se que os postos médios relativos a cada um dos tratamentos pertencem a diferentes conjuntos de postos médios iguais, isto é, eles foram estatisticamente diferentes entre si. De fato, obteve-se o valor de $H_0=56,525$ para a estimativa da estatística de Kruskal-Wallis, que foi significativa porque a esse valor se correspondeu um $p=0,0001$ na distribuição de quiquadrado (χ^2) com quatro graus de liberdade. Assim, houve evidência amostral para se

rejeitar a hipótese de que os tratamentos tenham induzido iguais efeitos sobre o grau do IBR.

A partir dos valores dos postos médios relativos aos tratamentos, na Tabela 4, foi possível levantar os questionamentos para a formulação de testes adicionais, a saber:

- os tratamentos EDTA 24%, Cloridrato. de Tetraciclina e Citrato de Sódio a 30% induziram efeitos iguais sobre o IBR?;
- os tratamentos EDTA 24% e Ácido Cítrico a 25% induziram efeitos iguais sobre o IBR?;
- o tratamento Controle exerceu sobre o IBR um efeito maior do que o exercido pelo tratamento Citrato de Sódio a 30%?.

Aplicando-se o teste de Kruskal-Wallis aos dados do IBR relativos aos tratamentos do primeiro questionamento acima, observou-se um valor $H_0=8,313$, que foi significativo porque $p=0,016$ na distribuição de quiquadrado (χ^2) com dois graus de liberdade, o que nos levou à afirmação de que o tratamento EDTA 24% apresentou um posto médio menor do que os dos outros dois tratamentos, Cloridrato de Tetraciclina e Citrato de Sódio a 30%, que apresentaram postos médios iguais entre si.

Relativamente aos tratamentos que figuram no segundo questionamento, a aplicação da estatística Z normal reduzida como aproximação do teste de Mann-Whitney, pois o número de observações em cada um deles foi maior do que 10, resultou num $Z_0= - 1,811$ que foi não significativo porque

$p=0,126$. Desse modo, segue-se que esses dois tratamentos induziram iguais efeitos sobre o IBR.

Quanto ao terceiro questionamento, devido ao fato de o número de observações em cada um deles ter sido maior do que 10, obteve-se um valor $Z_0 = -5,385$ que foi significativo porque $p < 0,0001$. Assim, houve evidência amostral para se afirmar que no grupo Controle ocorreu um posto médio maior do que o ocorrido no Citrato de Sódio a 30%.

A análise conjunta desses três testes adicionais permitiu a verificação de que o EDTA 24% e Ácido Cítrico a 25% induziram aos menores graus do IBR (mesmo conjunto A), seguidos dos tratamentos Cloridrato de Tetraciclina e Citrato de Sódio a 30% (mesmo conjunto B) vindo a seguir o tratamento Controle, no qual os graus de IBR foram maiores (conjunto C).

Em relação às amostras que receberam somente a aplicação de PRP, não foi possível realizar avaliação estatística, visto que nas fotomicrografias foi utilizada a letra "S" para presença e a letra "N" para ausência da rede de fibrina, conforme citado no capítulo "Material e Método" (Anexo 6). A leitura destes grupos demonstrou que somente as amostras condicionadas com ácido cítrico 25% e que receberam a aplicação prévia de PRP evidenciaram uma rede de fibrina bem definida. Os demais grupos mantiveram-se ou com *smear layer*, ou cemento ou dentina. Não foi possível saber se houve exposição de fibras colágenas após os tratamentos, visto que estas amostras não foram impregnadas por HMDS. Entretanto, supõe-se que isto tenha ocorrido, já que as amostras eram sempre provenientes do mesmo dente.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Para que ocorra a regeneração dos tecidos periodontais perdidos ou modificados devido à destruição causada por doença periodontal, é necessário que a placa bacteriana, o cálculo e outras substâncias citotóxicas presentes na superfície radicular sejam removidos^{45,58}. A raspagem e o aplainamento radicular são considerados os meios mais efetivos de remoção dos agregados e depósitos bacterianos presentes na superfície dental^{46,109}.

Contudo, a ação mecânica dos instrumentos sobre a superfície radicular de dentes afetados por doença periodontal resulta na formação de *smear layer*^{1,14,15,66,91,92,97}, que pode ser prejudicial ao processo de cura, principalmente, quando se visa à regeneração dos tecidos periodontais e, conseqüentemente, à obtenção de uma nova inserção conjuntiva.

O cimento radicular é o único tecido calcificado, cuja principal função é inserir as fibras do ligamento periodontal à raiz dental, a fim de sustentá-la no alvéolo. Quando o dente se encontra acometido por doença periodontal, ocorrem alterações em sua superfície capazes de impedir ou diminuir as chances de regeneração tecidual¹³.

Diante disso, grande atenção tem sido dada à utilização de agentes químicos, como meios auxiliares no preparo da superfície radicular instrumentada, para aumentar a possibilidade de nova inserção^{1,13,82,91,97,106}.

Segundo a literatura^{2-4,8,9,12,13,16,19,25,26,28,29,31,35,36,39,45,49,56,59,60,63,73,86,105,119,121}, a desmineralização de superfícies radiculares destituídas de sua inserção conjuntiva tem o potencial de promover a regeneração dos tecidos periodontais. Isto ocorre devido à descontaminação da superfície radicular, remoção da *smear layer* e exposição da matriz colágena da dentina e de outras proteínas da matriz que teriam o potencial de influenciar os eventos de cicatrização periodontal.

De acordo com esta premissa e baseando-se nesta revisão de literatura foi preciso determinar qual ou quais os agentes condicionantes (biomodificadores) mais eficientes. Os agentes mais estudados são o ácido cítrico, o cloridrato de tetraciclina (TTC HCl) e o EDTA. Estudos in vivo demonstraram a capacidade do ácido cítrico em favorecer a estabilização do coágulo sangüíneo sobre a superfície dental¹³ e a ligação entre o colágeno da matriz orgânica dental e o do tecido conjuntivo^{87,94,95}, que são fenômenos considerados importantes para a regeneração da inserção conjuntiva¹¹. Talvez estes tenham sido os motivos para que houvesse adesão de rede de fibrina somente nestas amostras quando aplicado puramente PRP.

Embora o EDTA possua alta capacidade para remover *smear layer* e expor a matriz colágena da dentina atuando em pH neutro (fato que o torna mais biocompatível do que o ácido cítrico e o cloridrato de tetraciclina), estudos preliminares^{51,62,63,80} indicam que este agente não favorece a adesão do coágulo sangüíneo à superfície radicular pelo fato de inibir a coagulação sangüínea.

O cloridrato de tetraciclina é um agente que possui diversas características desejáveis, tais como a capacidade de remover a *smear layer*^{1,66}, de expor a matriz colágena da estrutura dental^{1,19,41,51,80,87}, de remover endotoxinas da superfície radicular³⁵, de produzir superfícies com afinidade por fibronectina¹⁰⁵, de adsorver à superfície dental e de ser liberada lentamente (substantividade)^{10,11}, de inibir enzimas colagenolíticas associadas à destruição dos tecidos periodontais (MMPs)¹¹¹, de promover a estabilização do coágulo sanguíneo¹³, além de possuir ação antimicrobiana⁸⁵ particularmente contra periodontopatógenos¹⁰³. Em contrapartida, possui pH ácido, sendo que existe uma relação inversamente proporcional entre seu pH e sua concentração. Isto é significativo, pois pode interferir na viabilidade celular¹⁸ e nos eventos iniciais do processo de cicatrização periodontal^{3,103}.

Estudos^{41,109} baseados em microscopia eletrônica de varredura revelaram que a desmineralização promovida pelo ácido cítrico e pelo cloridrato de tetraciclina promoviam a remoção de *smear layer* e a exposição de fibras colágenas de dentina, assim como a ação quelante do EDTA^{18-22,97}. Esta exposição de colágeno dentinário teria seu efeito regenerativo associado ao fato da fibronectina (proteína extra-celular capaz de mediar processos de adesão celular) ter grande afinidade pelo mesmo⁵⁶.

Nesta pesquisa, quando aplicado o Índice de Biomodificação Radicular nas amostras que haviam sido apenas condicionadas e impregnadas com HMDS, foi observado que todos os agentes químicos promoveram a remoção de *smear layer* e a exposição de fibras colágenas, estando ora de

acordo^{1,14,15,19,20,92,97}, ora discordando^{9,21} da maioria dos estudos revisados na literatura. Isto talvez ocorra porque neste tipo de pesquisa não há padronização nem critérios para confecção de amostras, bem como, no modo, tempo e concentração que deveriam ser aplicados nas superfícies radiculares.

Desde 1999, Sampaio⁹¹ vem desenvolvendo estudos nesta linha de pesquisa, a fim de encontrar um agente biomodificador que possua características benéficas em relação à remoção de *smear layer*, exposição de fibras colágenas de dentina e adesão de coágulo sangüíneo em raízes comprometidas periodontalmente, bem como, quais as melhores formas e tempos de aplicação para cada um deles^{1,14,62,82,97,106}.

Baseando-se nestes estudos^{1,14,62,82,97,106}, o EDTA e o citrato de sódio^{14,62,82,97} foram aplicados na forma de pincelamento sobre as superfícies, pois sua agitação tende a diminuir a tensão superficial, aumentando o contato com a raiz e a sua efetividade^{15,18-21}. Já o ácido cítrico e a tetraciclina^{1,14,62} foram aplicados por meio de bolinhas de algodão, sendo que o primeiro entrou em contato com a superfície topicamente e a segunda solução foi aplicada com fricção vigorosa. Para todos os agentes químicos, o tempo de 3 minutos foi citado^{1,14,62,82,97,106} como o mais efetivo para a exposição da matriz colágena.

De acordo com Wikesjö et al.¹¹⁹ (1992) e Polson, Proye⁸⁴ (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.⁸⁷, 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^{1,14,15,18-21,81,92} descritos na literatura. Coldiron et al.³⁰ (1990) mostraram que mesmo após realizar 70 movimentos de raspagem em um único local, microscopicamente ainda era possível observar ilhotas de cimento em meio à dentina. Dessa forma, buscou-se aproximar a metodologia ao máximo possível dos procedimentos clínicos, onde em geral, a raspagem da superfície é realizada somente com instrumentos manuais e não há garantia da remoção de toda a camada de cimento. Além disso, Cogen et al.²⁹ (1984) e Zaman et al.¹²¹ (2000) 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.

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.⁷⁴ (2000), serve de proteção contra agentes desmineralizantes que possam atuar gerando cáries radiculares.

Utilizando macacos, Polson, Proye⁸⁴ (1983) reimplantaram dentes submetidos à raspagem e alisamento radicular do terço cervical. Em parte da

amostra a região raspada foi condicionada com ácido cítrico (grupo teste). Nas amostras não condicionadas houve formação de epitélio juncional longo e as condicionadas apresentaram ligação da fibrina do coágulo sangüíneo com a matriz orgânica dental, que posteriormente deu origem à inserção conjuntiva. Os autores concluíram que o condicionamento da superfície dental promove a ligação entre o colágeno da matriz dental (exposto pelo condicionamento com ácido cítrico) e a fibrina do coágulo sangüíneo e que essa ligação poderia impedir ou dificultar a migração apical do epitélio juncional e favorecer a formação da inserção conjuntiva^{60,99}.

Em 1988, Selvig et al.⁹⁴ demonstraram por meio de microscopia eletrônica a ocorrência de interdigitação entre as fibras colágenas do tecido conjuntivo e as da matriz dental que foram expostas pelo condicionamento ácido. Baker et al. 2000¹² propuseram um modelo experimental in vitro para verificar a adesão de células sangüíneas às superfícies radiculares biomodificadas, no qual os autores aplicavam sangue sobre as amostras condicionadas com ácido cítrico e aguardavam a coagulação. A análise ao microscópio eletrônico de varredura mostrou a adesão da rede de fibrina (do coágulo sangüíneo) às superfícies radiculares que foram condicionadas, enquanto não houve adesão de coágulo nas do grupo controle, devido, segundo os autores, à presença de *smear layer*.

O presente estudo difere dos demais, pois algumas amostras que receberam somente irrigação com soro fisiológico, quando observadas ao microscópio eletrônico, continham *smear layer* e outras, rede de fibrina e adesão de células sangüíneas. Contudo, não se pode esquecer que antes da aplicação de

uma gota de sangue, houve o pincelamento com PRP que, talvez, por ser um gel contendo alta concentração de fatores de coagulação e fatores de crescimento^{24,40,50,64,67,69,71}, tenha promovido um imbricamento mecânico entre o mesmo e o coágulo sangüíneo.

De acordo com Shuman⁹⁶ (2000), as fibras colágenas dentinárias favorecem duas etapas da formação do coágulo: a primeira é a atuação na ativação da cascata de coagulação que dá origem à 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 à formação do trombo, mas também, à liberação de moléculas biologicamente ativas que influenciam no processo de reparo tecidual^{5,50}.

Anitua et al.⁶ (2004) afirmam que as plaquetas são conhecidas pelo papel na hemostasia, onde auxiliam no controle da perda de sangue em locais de dano vascular. Para fazer isto, aderem-se, agregando-se umas as outras e formam uma superfície de pró-coagulantes que conduzem à geração de trombina e formação de fibrina, caracterizando o coágulo. Plaquetas também liberam substâncias que promovem cicatrização tecidual, influenciam na reatividade de células sangüíneas e vasculares, promovem a angiogênese e a inflamação. Elas contêm reservatórios de armazenamento de fatores de crescimento, inclusive

PDGF, TGF- β , e VEGF, como também citocinas e proteínas como CD40L. Os autores afirmam que o uso das plaquetas (PRP) em cirurgias de implante dentário com regeneração óssea guiada, é uma situação que apressa claramente a ossificação ao redor dos implantes de titânio. O resultado promove reduções no tempo requerido para estabilização do implante e uma taxa de sucesso aumentada.

O PRP é um produto derivado do sangue autógeno por processo laboratorial, colhido em período pré-operatório e rico em fatores de crescimento originários dos grânulos α -plaquetários⁶⁴. A composição do PRP é a seguinte: **Plasma** - fatores de coagulação (fibrinogênio, protombina); **Leucócitos** - sistema de defesa; **Plaquetas** - grânulos α -plaquetários (fatores de crescimento)⁶⁸.

Neste estudo foi observada a adesão de células sangüíneas em todos os grupos experimentais que receberam aplicação de PRP seguida de aplicação de sangue e, diferentemente das outras pesquisas encontradas na literatura em que se depositava somente sangue à superfície radicular, como o de Baker¹¹ (2000), Theodoro¹⁰⁶ (2003) e Leite et al.⁶³(2005), Leite⁶² (2006), houve presença de rede de fibrina e de células sangüíneas até nas amostras que não foram condicionadas (grupo controle). Provavelmente, a prévia utilização do PRP nas amostras que tinham apresentado exposição de fibras colágenas, devido à biomodificação das raízes, resultou na atração da rede de fibrina presente no coágulo propriamente dito, aumentando a adesão e adsorção de elementos sangüíneos e isto proporcionou um receptáculo favorável para a migração celular no processo de reparação tecidual, conforme a hipótese de Anitua et al. (2004)⁶.

A análise das amostras que receberam somente a aplicação de PRP demonstrou presença de células sangüíneas nas superfícies tratadas com ácido cítrico. Por não se encontrar estudos na literatura, sugere-se que esse fato seja decorrente da maior exposição de fibras colágenas neste grupo e ao seu modo de ação, uma vez que possui a propriedade apenas de promover a desmineralização da superfície radicular e isto o torna de fácil remoção pela irrigação com soro fisiológico. Os outros agentes estudados possuem propriedades quelantes, ou seja, ligam-se à superfície para remover íons cálcio, mas podem acabar se aderindo à mesma. Outra sugestão para o ocorrido seria o tempo de contato que o PRP teve com as superfícies radiculares, bem como, o tempo que se levou para aplicá-lo após sua ativação, já que desconhecia-se a quais grupos pertenciam cada amostra e, talvez, isto possa influenciar na melhor organização da agregação plaquetária.

O EDTA é um agente quelante de cálcio, o qual pode 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 desse agente possam ter ficado ligados à superfície radicular, levando ao retardo ou diminuição na probabilidade de 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.⁶¹ (1983) é a de que, aparentemente, o gel de EDTA cause alterações na morfologia da matriz colágena dental, alterando sua conformação.

Dessa forma, por ter comportamento químico quelante de cálcio, que pode levar à inibição da formação e aderência do coágulo à superfície dental,

bem como, capacidade de promover uma fragmentação plaquetária precoce¹¹³ isso possa explicar os resultados pouco satisfatórios do emprego do gel de EDTA na maioria dos trabalhos clínicos envolvendo a terapia periodontal^{22,70}. Porém, aqui nesta pesquisa sugere-se, devido à falta de relatos na literatura, que a prévia aplicação de PRP tenha ajudado na adesão do coágulo sangüíneo em algumas amostras.

No estudo de Leite⁶², em 2006, a aplicação tanto de ácido cítrico quanto de EDTA foram as que tiveram as maiores quantidades de amostras com fibras colágenas expostas e as que obtiveram as maiores quantidades de amostras com IAES 2 e 3, caracterizando moderada a alta quantidade de sangue aderidos. Na presente pesquisa, apesar de não ter ocorrido diferenças estatísticas entre os grupos quanto a este índice (Tabela 3, Anexo 7), foi observado que a maioria das amostras condicionadas com ácido cítrico e com citrato de sódio receberam IAES 3, ou seja, apresentaram densa rede de fibrina e grande adesão sangüínea, enquanto que os grupos tratados com EDTA ou TTC HCl somente demonstraram escassa quantidade ou ausência dos elementos citados (IAES 0 e 1).

Diferente do que se esperava, o grupo tratado com citrato de sódio apresentou moderada a alta incidência (mais de 50%) de adesão e adsorção de sangue e de rede de fibrina em sua superfície. Por falta de estudos presentes na literatura, sugere-se que, provavelmente, o uso deste agente químico na concentração de 30% foi capaz de remover a *smear layer* e de expor fibras colágenas, quelando a quantidade de cálcio necessária para promover a

biomodificação radicular, sendo totalmente removido das superfícies por meio de irrigação.

Outra provável hipótese é a de que este agente sendo, então, potente quelante, não tenha sido totalmente removido das superfícies radiculares e tenha, assim, por ser um anticoagulante que promove maior preservação da integridade da membrana plaquetária¹¹³, estimulado a formação do gel de PRP e acelerado o processo de coagulação, aumentando as chances de influenciar na reatividade entre as células sangüíneas presentes no coágulo com as fibras colágenas radiculares expostas e cobertas pela agregação plaquetária presente no PRP.

Trabalhos com fatores de crescimento^{65,88}, inclusive com plasma rico em plaquetas⁴⁰, fundamentaram bases para novas pesquisas em relação à neoformação tecidual, maturação óssea e inclusive cronologia de reparo ósseo⁷¹.

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

- Ocorreu biomodificação radicular em todos os grupos, contudo houve variação nesta frequência, sendo que o grupo controle foi o que apresentou maior quantidade de *smear layer*, com pouca ou nenhuma incidência de fibras colágenas;
- Não houve diferenças estatísticas entre os grupos em relação à adesão de células sangüíneas após aplicação de PRP e sangue;
- O ácido cítrico 25% e o citrato de sódio 30% apresentaram maior frequência de amostras com densa rede de fibrina com grande entrelaçamento e células sangüíneas aprisionadas;
- Após aplicação somente de PRP, as únicas amostras que demonstraram adesão da rede de fibrina foram as que receberam biomodificação com ácido cítrico 25%;
- Tanto o grupo controle, quanto aqueles que receberam tratamento biomodificador demonstraram adesão do coágulo à superfície dental, mesmo sem a remoção completa de *smear layer* e sem a exposição de fibras colágenas;

- Os resultados sugerem que o PRP tenha favorecido a estabilização do coágulo à superfície radicular.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

1. Abi Rached AD. 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 [Tese de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2003.
2. Aleo JJ, DeRenzis FA, Farber PA. In vitro attachment of human gingival fibroblasts to root surfaces. J Periodontol. 1975; 46:639-45.
3. Alger FA, Solt CW, Vuddhakanok S, Miles K. The histologic evaluation of new attachment in periodontally diseased human roots treated with tetracycline-hydrochloride and fibronectin. J Periodontol. 1990; 61:447-55.
4. American Academy of Periodontology. The potential role of growth and differentiation factors in periodontal regeneration. (position paper). J Periodontol. 1996; 67:545-53.
5. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. Int J Oral Maxillofac Implants. 1999; 14:529-35.
6. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. Thromb Haemost. 2004; 91:4-15.

* De acordo com a norma Vancouver. Disponível no site: <http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform-requirements.html>

7. 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.* 1997; 28:93-7.
8. Babay N. The effect of tetracycline hydrochloride in the attachment of gingival fibroblasts. A scanning electron microscopy study on the effect of ultrasonic scaling before root conditioning. *Odontostomatol Trop.* 2002; 25:13-7.
9. Baker DL, Stanley Pavlow SA, Wikesjö UM. Fibrin clot adhesion to dentin conditioned with protein constructs: an in vitro proof-of-principle study. *J Clin Periodontol.* 2005; 32:561-6.
10. Baker PJ, Evans RT, Coburn RA, Genco RJ. Tetracycline and its derivatives strongly bind to and are released from the tooth surface in active form. *J Periodontol.* 1983; 54:580-5.
11. Baker PJ, Slots J, Genco RJ, Evans RT. Minimal inhibitory concentrations of various antimicrobial agents for human oral anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1983; 24:420-4.
12. Baker DL, Stanley Pavlow SA, Wikesjö UM. Fibrin clot adhesion to dentin conditioned with protein constructs: an in vitro proof-of-principle study. *J Clin Periodontol.* 2005; 32:561-6.
13. 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.* 1990; 32:281-93.

14. Batista LHC. Estudo in vitro da eficácia de um gel de EDTA-T na remoção da "smear layer" da superfície radicular [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2002.
15. Batista LHC, Sampaio JEC, Pilatti GL, Shibli JA. Efficacy of EDTA-T gel for smear layer removal at root surfaces. *Quintessence Int.* 2005; 36:551-8.
16. 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.* 1998; 18:171-9.
17. Bergström J. Tobacco smoking and subgingival dental calculus. *J Clin Periodontol.* 2005; 32:81-8.
18. Blomlöf J, Lindskog S. Periodontal tissue-vitality after different etching modalities. *J Clin Periodontol.* 1995; 22:464-8.
19. Blomlöf J, Lindskog S. Root surface texture and early cell and tissue colonization after different etching modalities. *Eur J Oral Sci.* 1995; 103:17-24.
20. Blomlöf PS, Blomlöf B, Lindskog S. Smear removal and collagen exposure after non-surgical root planing followed by etching with an EDTA gel preparation. *J Periodontol.* 1996; 67: 841-5.
21. Blomlöf J, Blomlöf L, Lindskog S. Effect of different concentrations of EDTA on smear layer removal and collagen exposure in periodontitis-affected root surfaces. *J Clin Periodontol.* 1997; 24:534-7.
22. 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.* 2000; 20:566-73.

23. Bouchard P, Nilveus R, Etienne D. Clinical evaluation of tetracycline HCl conditioning in the treatment of gingival recessions. A comparative study. *J Periodontol.* 1997; 68:262-9.
24. Carlson ER. Bone grafting the jaws in the 21st century: the use of platelet-rich plasma and bone morphogenetic protein. *Alpha Omegan.* 2000; 93:26-30.
25. Caton JG, Greenstein G. Factors related to periodontal regeneration. *Periodontology 2000.* 1993; 1: 9-15.
26. Chandra RV, Jagetia GC, Bhat KM. The attachment of V79 and human periodontal ligament fibroblasts on periodontally involved root surfaces following treatment with EDTA, citric acid, or tetracycline HCL: an SEM in vitro study. *J Contemp Dent Pract.* 2006; 7:44-59.
27. Christersson LA, Norderyd OM, Puchalsky CS. Topical application of tetracycline-HCl in human periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1993; 20:88-95.
28. Claffey N, Bogle G, Bjorvatn K, Selvig KA, Egelberg J. Topical application of tetracycline in regenerative periodontal surgery in beagles. *Acta Odontol Scand.* 1987; 45:141-6.
29. Cogen RB, Al-Joburi W, Gantt DG, Denys FR. Effect of various root surface treatments on the attachment and growth of human gingival fibroblasts: histologic and scanning electron microscopic evaluation. *J Clin Periodontol.* 1984; 11:531-9.
30. Coldiron NB, Yukna RA, Weir J, Caudill RF. A quantitative study of cementum removal with hand curettes. *J Periodontol.* 1990; 61:293-9.

31. 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.* 1981; 16:117-22.
32. Cuff MJ, Mcquade MJ, Scheidt MJ, Sutherland DE, Van Dyke TE. The presence of nicotine on root surfaces of periodontally diseased teeth in smokers. *J Periodontol.* 1989; 60:564-9.
33. Delazari FM, Gerlach RF, Joly JC, de Lima AF. Scanning electron microscopy study of the effect of tetracycline HCl on smear layer removal and fibrin network formation. *Braz Dent J.* 1999; 10:81-7.
34. Dewan DM, Writer WD, Wheeler AS, James FM^{3RD}, Floyd HM, Bogard TD, Rhyne L. Sodium citrate premedication in elective caesarean section patients. *Can Anaesth Soc J.* 1982; 29:355-8.
35. Fardal O, Lowenberg BF. A quantitative analysis of the migration, attachment, and orientation of human gingival fibroblasts to human dental root surfaces in vitro. *J Periodontol.* 1990; 61: 529-35.
36. Frantz B, Polson A. Tissue interactions with dentin specimens after demineralization using tetracycline. *J Periodontol.* 1988; 59: 714-21.
37. Fukuda A, Ishida H, Kubota M, Kojima Y, Mizobata Y, Matsuoka T et al. Clinical data obtained through coagulation testing suggests that hypothermia exerts influence on a patient's blood coagulation reaction. *Rinsho Byori,* 2000; 48:1102-8.
38. Gabler WL, Creamer HR. Suppression of human neutrophil function by tetracycline. *J Periodontal Res.* 1991; 26:52-8.

39. Gamal AY, Mailhot JM. The effects of EDTA gel conditioning exposure time on periodontitis-affected human root surfaces: surface topography and PDL cell adhesion. *J Int Acad Periodontol.* 2003; 5:11-22.
40. Garg AK. The future role of growth factors in bone grafting. *Dent Implantol Update.* 1999; 10:5-7.
41. Garrett JS, Crigger M, Egelberg J. Effects of citric acid on diseased root surfaces. *J Periodont Res.* 1978; 13: 155-63.
42. Golub LM, Wolff M, Roberts S, Lee HM, Leung M, Payonk GS. Treating periodontal diseases by blocking tissue-destructive enzymes. *J Am Dent Assoc.* 1994; 125(2):163-9.
43. Gomes BC, Golub LM, Ramamurthy NS. Tetracyclines inhibit parathyroid hormone-induced bone resorption in organ culture. *Experientia.* 1984; 40:1273-5..
44. Gray JC, Elves MW. Donor cells contribution to osteogenesis in experimental cancellous bone grafts. *Clin Orthop.* 1982; 163:261-71.
45. Hanes PJ, O'brien NJ, Garnick JJ. A morphological comparison of radicular dentin following root planing and treatment with citric acid or tetracycline HCl. *J Clin Periodontol.* 1991; 18:660-8.
46. Hanes PJ, Polson AM, Ladenheim S. Cell and fiber attachment to demineralized dentin from normal root surfaces. *J Periodontol.* 1985; 56:752-6.
47. Harker LA, Finch CA. Trombokinectics in man. *J Clin Invest.* 1969; 48:963-74.

48. Healy DT, Egan EL. Centrifugal and anticoagulant induced variations in platelet rich plasma and their influence on platelet aggregation. *Scand J Haematol.* 1984; 32:452-6.
49. Hiatt WH, Stallard RE, Butler ED, Badgett B. Repair following muco-periosteal flap surgery with full gingival retention. *J Periodontol.* 1968; 39:11-6.
50. Hudson-Goodman P, Girard N, Jones MB. Wound repair and the potential use of growth factors. *Heart Lung.* 1990; 19:379-84.
51. Isik AG, Tarim B, Hafez AA, Yalcin FS, Onan U, Cox CF. A comparative scanning electron microscopic study characteristics or demineralized dentin root surface using different tetracycline HCL concentrations and applications times. *J Periodontol.* 2000; 71:219-25.
52. 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.* 1997; 24:589-94.
53. Jenny RJ, Mann KG. Factor V: a prototype pro-cofactor for vitamin K-dependent enzyme complexes in blood clotting. *Baillieres Clin Haematol.* 1989; 2:919- 44.
54. Jones WA, O'leary TJ. The effectiveness of *in vivo* root planing in removing bacterial endotoxin from the roots of periodontally involved teeth. *J Periodontol.* 1978; 49:337-42.
55. Kassab M, Cohen RE. The effect of root modification and biomodification on periodontal therapy. *Compend Contin Educ Dent.* 2003; 24:31-4.

56. Kleinman HK, Klebe RJ, Martin GR. Roll of collagen matrices in the adhesion and growth of cells. *J Cell Biol.* 1981; 88: 473-85.
57. Labahn R, Fahrenbach WH, Clark SM, Lie T, Adams DF. Root dentin morphology after different modes of citric acid and tetracycline hydrochloride conditioning. *J Periodontol.* 1992; 63:303-9.
58. Lafferty TA, Gher ME, Gray JL. Comparative SEM study on the effect of acid etching with tetracycline HCl or citric acid on instrumented periodontally-involved human root surfaces. *J Periodontol.* 1993; 64:689-93.
59. Lan WC, Lan WH, Chan CP, Hsieh CC, Chang MC, Jeng JH. The effects of extracellular citric acid acidosis on the viability, cellular adhesion capacity and protein synthesis of cultured human gingival fibroblasts. *Aust Dental J.* 1999; 44:123-30.
60. 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.* 1988; 59:95-9.
61. Lasho DJ, O'leary TJ, Kafrawy AH. A scanning electron microscope study of the effects of various agents on instrumented periodontally involved root surfaces. *J Periodontol.* 1983; 54:210-20.
62. Leite FRM. 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 de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2006.
63. Leite FRM, Moreira CS, Theodoro LH, Sampaio JEC. Blood cell attachment to root surfaces treated with EDTA gel. *Braz Oral Res.* 2005; 19: 88-92.

64. Lynch SE, Willians RC, Polson AM, Howell TH, Reddy MS, Zappa UE et al. A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. *J Clin Periodontol.* 1989; 16:545-8.
65. Lynch SE, Buser D, Hernandez RA, Weber HP, Stich H, Fox CH et al. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol.* 1991; 62:710-6.
66. Madison JG 3rd, Hokett SD. The effects of different tetracyclines on the dentin root surface of instrumented, periodontally involved human teeth: a comparative scanning electron microscope study. *J Periodontol.* 1997; 68:739-45.
67. Martins MC. Utilização do plasma rico em plaquetas nos procedimentos cirúrgicos de elevação de seio maxilar. Estudo histomorfométrico em humanos. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2003.
68. Marx RE. Platelet-rich plasma: a source of multiple autologous growth factors for bone grafts. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE. *Tissue engineering. applications in maxillofacial surgery and periodontics.* Illinois: Quintessence; 1999. p.71-82.
69. Marx RE. Platelet-Rich Plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* 2001; 10:225-8.
70. Marx RE. Platelet-rich plasma: Evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 62:489-96.
71. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff JR. Platelet-rich plasma. Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998; 85:638-46.

72. 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.* 1998; 25:707-14.
73. McClain PK, Schallhorn RG. Long-term assessment of combined osseous composite grafting, root conditioning, and guided tissue regeneration. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1993; 13:9-27.
74. McIntyre JM, Featherstone JD, Fu J. Studies of dental root surface caries. 2: The role of cementum in root surface caries. *Aust Dent J.* 2000; 45:97-102.
75. Nalbandian J, Cote N. Direct histological comparison of periodontal wound healing in the beagle dog with and without citric acid conditioning. *J Periodontal Res.* 1982; 17:552-62.
76. Newman MG, Takei HH, Carranza FA. Carranza - Periodontia clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. 899 p.
77. Nishioka T, Yokota M, Tsuda I, Tatsumi N. Flow cytometric analysis of platelet activation under calcium ion-chelating conditions. *Clin Lab Haematol.* 2002; 24:115-9.
78. Novaes Jr AB, Batista Jr EL. Técnicas regenerativas em periodontia. In: Tunes UR, Rapp GE. Atualização em periodontia e implantodontia. São Paulo: Artes Médicas; 1999. p. 179-225.
79. Nuckton TJ, Goldreich D, Rogaski KD, Lessani TM, Higgins PJ, Claman DM. Hypothermia from prolonged immersion: biophysical parameters of a survivor. *J Emerg Med.* 2002; 22:371-4.

80. Omori N, Kobayashi H, Tsutsui T. Quantitative comparison of cytotoxic effects of tetracyclines and fluoroquinolones on human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res.* 1999; 34:290-5.
81. Petrunaro PS. Using platelet-rich plasma to accelerate soft tissue maturation in esthetic periodontal surgery. *Compend Contin Educ Dent.* 2001; 22:729-46.
82. Pilatti GL. Estudo "in vitro" da eficácia de um gel de Edta na remoção da "Smear Layer" da superfície radicular [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2001.
83. Polson AM, Caton J. Etiology of periodontal diseases. *Curr Opin Dent.* 1982; 1:17-28.
84. Polson AM, Proye MP. Fibrin linkage: a precursor for new attachment. *J Periodontol.* 1983; 54: 141-7.
85. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *Pharmacology.* 3rd ed. New York: Churchill Livingstone; 2001.
86. Register AA, Burdick FA. Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized in situ. II. Defect repair. *J Periodontol.* 1976; 47:497-505.
87. Ririe CM, Crigger M, Selvig KA. Healing of periodontal connective tissues following surgical wounding and application of citric acid in dogs. *J Periodontal Res.* 1980; 15:314-27.
88. Ross R, Raines EW, Bowen DF. The biology of platelet derived growth factor. *Cell.* 1986; 46:155-69.

89. Ruggeri ZM. Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Thromb Haemost.* 1997; 78:611-6.
90. Sammons PR, Wang HL, Chiego DJ, Castelli WA, Smith BA. Effect of root conditioning on periodontal wound healing with and without guided tissue regeneration: a pilot study II. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1994; 14:62-9.
91. Sampaio JEC. Eficiência de detergentes e EDTA na remoção da "smear layer" de superfícies radiculares submetidas à raspagem e aplainamento: análise através da microscopia eletrônica de varredura. [Tese de Livre Docência]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 1999.
92. Sampaio LM. Eficiência do Cloridrato de Tetraciclina na remoção da "smear layer", após instrumentação radicular; em diferentes concentrações, tempos e modos de aplicação. Análise através de microscopia eletrônica de varredura [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 1998.
93. Sánchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is Platelet-Rich Plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003; 18: 93-103.
94. Selvig KA, Bogle G, Claffey NM. Collagen linkage in periodontal connective tissue reattachment. An ultrastructural study in beagle dogs. *J Periodontol.* 1988; 59(11):758-68.
95. Selvig KA, Ririe CM, Nilveus R, Egelberg J. Fine structure of new connective tissue attachment following acid treatment of experimental furcation pockets in dogs. *J Periodontal Res.* 1981; 16:123-9.

96. Shuman M. Hemorrhagic disorders: abnormalities of platelet and vascular function. In: Goldman L, Bennett JC. Cecil textbook of medicine. 20th ed: Philadelphia: Saunders; 2000. p. 23.
97. Sousa CP. Estudo in vitro da eficácia do gel de EDTA 24% na remoção de “smear layer” e exposição de fibras colágenas da superfície radicular [Tese de Doutorado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2004.
98. Stabholz A, Kettering J, Aprecio R, Zimmerman G, Baker PJ, Wikesjö UM. Retention of antimicrobial activity by human root surfaces after in situ subgingival irrigation with tetracycline HCl or chlorhexidine. *J Periodontol.* 1993; 64:137-41.
99. Steinberg AD, Willey R. Scanning electron microscopy observations of initial clot formation on treated tooth surfaces. *J Periodontol.* 1988; 59: 403-11.
100. Sterrett JD, Bankey T, Murphy HJ. Dentin demineralization. The effects of citric acid concentration and application time. *J Clin Periodontol.* 1993; 20:366-70.
101. Sterrett JD, Dhillon M, Murphy HJ. Citric acid demineralization of cementum and dentin: the effect of application pressure. *J Clin Periodontol.* 1995; 22:434-41.
102. Sterrett JD, Simmons J, Whitford G, Russell CM. Tetracycline demineralization of dentin: the effects of concentration and application time. *J Clin Periodontol.* 1997; 24:457-63.
103. Sutter VL, Jones MJ, Ghoneim AT. Antimicrobial susceptibilities of bacteria associated with periodontal disease. *Antimicrob Agents Chemother.* 1983; 23:483-6.

104. Terranova VP, Martin GR. Molecular factors determining gingival tissue interaction with tooth structure. *J Periodontal Res.* 1982; 17:530-3.
105. Terranova VP, Franzetti LC, Hic S, DiFlorio RM, Lyall RM, Wikesjö UM et al. A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth. *J Periodontal Res.* 1986; 21:330-7.
106. Theodoro LH. 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 [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2003.
107. Trikilis N, Rawlinson A, Walsh TF. Periodontal probing depth and subgingival temperature in smokers and non-smokers. *J Clin Periodontol.* 1999; 26:38-43.
108. Trombelli L, Calura G. Complete root coverage of denuded root surface using expanded polytetrafluoroethylene membrane in conjunction with tetracycline root conditioning and fibrin-fibronectin glue application: case reports. *Quintessence Int.* 1993; 24:847-52.
109. Trombelli L, Scabia A, Zang F, Griselli A, Wikesjö UME, Calura G. Effect of tetracycline HCl on periodontally-affected human root surfaces. *J Periodontol.* 1995; 66: 685-91.
110. Van Winkelhoff AJ, Bosch-Tijhof CJ, Winkel EG, Van Der Reijden WA. Smoking affects the subgingival microflora in periodontitis. *J Periodontol.* 2001; 72:666-71.

111. Wang HL, Doctor MR, Castelli WA, Chiego DJ, Smith BA. Effect of root conditioning on periodontal microvascular wound healing with and without guided tissue membrane: a pilot study. *Periodontal Clin Investig.* 1993; 15:19-27.
112. Warshaw AL, Laster L, Shulman NR. Protein synthesis by human platelets. *J Biol Chem.* 1967; 242: 2094-7.
113. Wehmeier A, Schneider W. Plateled volume parameters as a diagnostic tool: the influence of anticoagulation and storage conditions on plateled impedance volume. *Klin Wochenschr.* 1989; 67:980-4.
114. Weyland W, Fritz U, Fabian S, Jaeger H, Crozier T, Kietzmann D et al. Postoperative warming therapy in the recovery room. A comparison of radiative and convective warmers. *Anaesthesist.* 1994; 43:648-57.
115. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997; 55:1294-9.
116. Wikesjö UM, Baker PJ, Christersson LA, Genco RJ, Lyall RM, Hic S et al. A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment conditions dentin surfaces. *J Periodontal Res.* 1986; 21:322-9.
117. Wikesjö UM, Claffey N, Christersson LA, Franzetti LC, Genco RJ, Terranova VP et al. Repair of periodontal furcation defects in beagle dogs following reconstructive surgery including root surface demineralization with tetracycline hydrochloride and topical fibronectin application. *J Clin Periodontol.* 1988; 15:73-80.

118. Wikesjö UM, Nilvéus R. Periodontal repair in dogs. Healing patterns in large circumferential periodontal defects. *J Clin Periodontol.* 1991; 18: 60-4.
119. Wikesjö UM, Nilvéus R, Selvig KN. Significance of early healing events on periodontal repair: a review. *J Periodontol.* 1992; 63: 158-65.
120. Witte LD, Kaplan KL, Nossel HL, Lages BA, Weiss HJ, Goodman DS. Studies of the release from human platelets of the growth factor for cultured human arterial muscle cell. *Circ Res.* 1978; 42: 402-9.
121. Zaman KU, 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.* 2000; 71:1094-9.
122. Zuabi O, Machtei EE, 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.* 1999; 70:1240-6.

ANEXOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



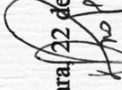
Comitê de Ética em Pesquisa

Certificado

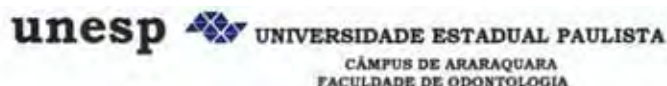
Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**EFEITO DO CONDICIONAMENTO RADICULAR NA ADESÃO DE CÉLULAS SANGÜÍNEAS SOBRE SUPERFÍCIES RADICULARES**", sob o protocolo nº 10/04, de responsabilidade do Pesquisador (a) **JOSE EDUARDO CEZAR SAMPAIO**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho 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.


Profª Drª **Marian 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


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 Hamãã, 1680 – CEP 14801-903 – Caixa Postal 331 – Fax (0xx16) 201-6314 – Araraquara – SP
 Fone: (0xx16) 201-6342 // e-mail: odologia@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.

....., dede 200...

.....
Assinatura do paciente

.....
Assinatura do pesquisador responsável

Pesquisador **CRO**.....

ANEXO 4



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: Sanguê

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
L.H.C.M. em %.....	34,2		32 - 36
R.D.W. em %.....	12,4		11,5 - 14,5

Sem alterações morfológicas.

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-B-7943



hormônios
 bioquímica
 imunologia
 hematologia
 parasitologia
 microbiologia
 biologia molecular
 marcadores tumorais

Paciente: **FABIO RENATO MANZOLLI LEITE**

Idade....: 23 Anos

Mé.dico...: 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. Aauri 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

ANEXO 5

IMPREGNAÇÃO COM HMDS

	Foto (2000x)	1	2	3	Mediana
I	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
	290976	3	3	3	3
	290951	3	3	3	3
	290961	3	3	3	3
	290957	2	2	2	2
II	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
	290977	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	
III	280910	2	2	2	2
	280902	2	2	2	2
	280903	1	1	1	1
	290966	2	2	2	2
	290978	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
IV	280909	2	2	2	2
	290970	2	2	2	2
	290939	ANULADA			
	290968	2	2	2	2
	290979	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	
V	280915	2	2	2	2
	290973	2	2	2	2
	290930	2	2	2	2
	290971	2	2	2	2
	290980	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	

ANEXO 6

AMOSTRAS QUE RECEBERAM APLICAÇÃO DE PRP

Grupo	500x	1000x	2000x	3500x	1 ^a	2 ^a	3 ^a	Média
I	061225		061226					N
			061234					N
			061235					N
			071277					N
			061229					N
			071266	071267				N
			061224					N
			071272					N
II			061256					N
			061257					N
			061258					N
			071268					N
			061231	061230				N
			071278					N
			061223					N
			071271					N
III			061263					N
			061242	061241				S
			061244	061243				S
			061222	061221				S
			071264	071265				S
			071274	071273				S
			061262	061261				S
			071270	071269				S
IV			061237	061236				N
			061239	061238				N
			061259					N
			061219					N
			061240					N
			061245					N
			061246					N
			061247					N
V			061254					N
			061255					N
			061253					N
			061220					N
			061250					N
			061260					N
			061249	061248				N
			061252	061251				N

ANEXO 7

AMOSTRAS QUE RECEBERAM APLICAÇÃO DE **PRP E****SANGUE**

Grupo	500x	1000x	1^a	2^a	3^a	Média
I	071280	071279	3	2	3	3
	071292	071291	1	1	1	1
	071284	071283	0	0	0	0
	071282	071281	2	3	2	2
	071286	071285	2	1	2	2
	071288	071287	1	1	1	1
	071290	071289	1	1	1	1
	071276	071275	3	3	3	3
II	071302	071301	1	1	1	1
	071304	071303	1	1	1	1
		071295	1	1	1	1
		071298	0	0	0	0
	071200	071299	0	0	0	0
	071297	071296	2	1	2	2
	071294	071293	3	3	3	3
	111306	111305	2	2	2	2
III	111322	111321	3	3	3	3
	111324	111323	3	3	3	3
	111316	111315	0	0	0	0
	111318	111317	1	1	1	1
	111312	111311	3	3	3	3
	111308	111307	3	3	3	3
	111314	111313	0	0	0	0
	111310	111309	3	2	3	3
IV	111328	111327	3	3	3	3
	111330	111329	2	2	2	2
	111326	111325	1	0	1	1
	111336	111335	1	1	1	1
	111338	111337	3	3	3	3
	111334	111333	0	0	0	0
	111332	111331	0	0	0	0
	111320	111319	3	3	3	3
V	111340	111339	1	1	1	1
	111342	111341	2	2	2	2
	111344	111343	3	2	3	3
	111346	111345	3	3	3	3
	111348	111347	2	2	2	2
	111350	111349	2	2	2	2
	061233	061232	3	3	2	3

	061228	061227	3	3	3	3
--	--------	--------	---	---	---	---

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 19 de março de 2008.

ANDRÉA ABI RACHED DANTAS