



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

MONIQUE COSTA MOREIRA FRANÇA

**INFLUÊNCIA DO EDTA E ÁCIDO HIALURÔNICO NA VIABILIDADE E
EXPRESSÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS DE FIBROBLASTOS DO
LIGAMENTO PERIODONTAL**

2017

MONIQUE COSTA MOREIRA FRANÇA

**INFLUÊNCIA DO EDTA E ÁCIDO HIALURÔNICO NA VIABILIDADE E
EXPRESSÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS DE FIBROBLASTOS DO
LIGAMENTO PERIODONTAL**

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade de Endodontia.

Orientador: Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo

Co-Orientadora: Prof. Titular Marcia Carneiro Valera

São José dos Campos

2017

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera (co-orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Gleyce Oliveira Silva

Universidade Nove de Julho (Uninove)

Profa. Dra. Adriana de Jesus Soares

Universidade de Campinas (Unicamp)

Faculdade de Odontologia de Piracicaba

Prof. Adj. Eduardo Bresciani

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Adj. Cláudio Antonio Talge Carvalho

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 06 de Dezembro de 2017.

DEDICATÓRIA

Primeiramente à **Deus** por me dar força e serenidade para seguir em frente e ultrapassar todos os obstáculos.

Aos meus pais, **Edmar Moreira** e **Ana Elizabeth Costa Moreira**, pelo carinho e dedicação. Não há palavras suficientes para agradecer-lhes por tudo de bom que ambos fizeram e ainda fazem por mim. É por vocês que me dedico e sigo em frente.

Ao meu marido, **Fernando Antônio Ebum de Siqueira França**, pelo carinho, paciência e dedicação. Ao meu lado tornou minha caminhada mais suave, sempre me dando forças e compreendendo os momentos de ausência.

Aos meus filhos **Eduardo** e **Sofia** que vieram para transformar a minha vida. Além de me tornarem mãe, ensinam a cada dia o poder transformador do amor incondicional, sem o qual eu não conseguiria estar aqui terminando mais uma etapa.

Às minhas irmãs, **Amanda**, **Paloma** e **Tatiana**, pelo carinho e alegria mesmo nos momentos mais difíceis e fatigantes. Sem vocês eu não teria conseguido.

À minha grande amiga **Tânia Mara da Silva**, que está comigo desde a graduação, nunca me abandonou. Minha irmã de coração e alma. Temos uma ligação forte e de muito respeito, sempre torcendo para sermos felizes naquilo que nos proponhamos a fazer. Muito obrigada por fazer parte da minha vida.

Aos meus cunhados **Christiano Correa Teixeira** e **Tiago Bosqueiro** que me deram apoio seja com palavras ou com ajuda durante todas as fases do meu Doutorado.

Ao meu querido orientador, **Carlos Henrique Ribeiro Camargo**, pelos ensinamentos e pela compreensão nos momentos mais difíceis. Nestes cinco anos entre Mestrado e Doutorado, soube compreender meus momentos de ausência. Saiba que estudar nesta instituição foi uma terapia para mim. Muito obrigada pelo apoio.

A minha querida co-orientadora **Márcia Carneiro Valera**, que desde a graduação e por tantos outros momentos nesta caminhada pela pós-graduação me ensinou a nunca desistir e seguir com minhas metas. Muito obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

Aos docentes da Endodontia: Ana Paula Martins Gomes, Cláudio Antonio Talge Carvalho e Frederico Canato Martinho pelos ensinamentos que me foram concedidos.

Aos queridos amigos e amigas da pós-graduação: Alessandra, Amjad, Carlos, Cássia, Cláudia, Daiana, Diego, Esteban, Felipe Matos, Fernanda, Felipe Machado, Lais, Rayana e Tatiane, pela amizade construída durante o curso de Doutorado.
Pelo companheirismo de cada uma de vocês.

À querida amiga **Gleyce**, pela ajuda e pelo companheirismo de todos os dias. Foi uma das amizades mais sinceras que a pós-graduação me proporcionou.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora.

À **CAPES** pela concessão da bolsa de estudos que tornou possível a realização deste trabalho.

À todos os funcionários que direta ou indiretamente muito contribuíram em meu trabalho e para o convívio diário.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT) -UNESP pelo incentivo durante o desenvolvimento do curso.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE QUADROS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Tratamento de dentes avulsionados.....	20
2.1.1 Uso do ácido hialurônico.....	21
2.1.2 Aplicação de EDTA.....	25
2.1.3 Remoção do ligamento periodontal e tempo de ressecamento da superfície radicular.....	28
2.2 Citocinas inflamatórias.....	32
3 PROPOSIÇÃO.....	36
4 MATERIAL E MÉTODO.....	37
4.1 Preparo dos discos.....	37
4.1.1 Tratamento dos discos com EDTA e ácido hialurônico.....	39
4.2 Cultivo das células.....	42
4.2.1 Descongelamento.....	43
4.2.2 Troca de meio.....	44
4.2.3 Subcultura.....	44
4.2.4 Contagem de células.....	46
4.2.5 Plaqueamento.....	47
4.3 Viabilidade celular - Ensaio XTT.....	48
4.4 Verificação da adesão celular por MEV.....	49
4.5 Quantificação de citocinas pelo teste de ELISA (ELISA- enzymelinked Immunosorbent assay).....	50
4.6 Análise Estatística.....	55
5 RESULTADOS.....	56
5.1 Viabilidade celular pelo teste de XTT.....	56
5.1.1 Análise descritiva.....	56
5.1.2 Análise Inferencial.....	57
5.1.2.1 Grupo sem ressecamento da superfície radicular.....	57
5.1.2.2 Grupo com 1 hora de ressecamento da superfície radicular.....	58
5.1.2.3 Grupo com 24 horas de ressecamento da superfície radicular.....	60
5.2 Quantificação de citocinas pelo teste de ELISA.....	61

5.3 Imagens ilustrativas da adesão celular por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	67
6 DISCUSSÃO.....	69
6.1 Discussão da Metodologia.....	69
6.2 Discussão dos Resultados.....	71
7 Conclusão.....	77
REFERÊNCIAS.....	78
APÊNDICES.....	90
ANEXOS.....	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Obtenção dos discos de dentina com cimento.....	38
Figura 2 - Padronização da altura dos discos de dentina e cimento.....	38
Figura 3 - Limpeza dos discos em cuba ultrasônica.....	39
Figura 4 – Divisão dos grupos experimentais.....	40
Figura 5 – Tratamento dos discos com EDTA17% e ácido hialurônico.....	41
Figura 6 – Material para cultura de células.....	42
Figura 7 – Descongelamento das células PDLF.....	43
Figura 8 – Subcultivo das células PDLF.....	45
Figura 9 – Preparo para realização da contagem celular.....	46
Figura 10 – Placa de 96 poços com os discos de dentina e cimento.....	47
Figura 11 – Ensaio de XTT.....	48
Figura 12 – Discos para realização de análise por MEV.....	50
Figura 13 – Obtenção do sobrenadante dos discos para o teste de ELISA.....	51
Figura 14 – Placa de 96 poços para o teste de ELISA.....	52
Figura 15 – Preparo da curva padrão para o teste de ELISA.....	53
Figura 16 – Placa de 96 poços com as soluções A+B para o teste de ELISA....	54
Figura 17 – Placa de 96 poços com a solução de stop para o teste de ELISA...	55
Figura 18 – Gráfico de colunas (média±DP) dos valores de viabilidade celular (%) segundo os tratamentos da superfície dos discos dentina/cimento sem ressecamento e com ressecamento de 1h e 24h.....	57
Figura 19 – Gráficos de curva-padrão e média para a IL-1 β em células de PDLF..	62
Figura 20 - Gráficos de curva-padrão e média para a IL-6 em células de PDLF.....	63
Figura 21 - Gráficos de curva-padrão e média para a IL-8 em células de PDLF.....	65
Figura 22 - Gráficos de curva-padrão e média para a TNF- α em células de PDLF	66
Figura 23 - Fotografia ilustrativa da adesão de fibroblastos na superfície do cimento nos discos de dentina e cimento dos grupos sem ressecamento, 1 h e 24h de ressecamento. Imagem por MEV - aumento 1000x.....	68

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Citocinas pró-inflamatórias.....	90
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de média $\pm$ desvio-padrão da viabilidade celular (%) em cada grupo.....	56
Tabela 2 –Resultado do teste ANOVA (Análise de Variância) 1 fator, para o fator viabilidade celular sem ressecamento.....	58
Tabela 3 – Valores de média $\pm$ desvio-padrão da viabilidade celular (%) e resultados do teste de Tukey para o fator tratamento.....	58
Tabela 4 - Resultado do teste ANOVA 1 fator tratamento com 1 hora de ressecamento.....	59
Tabela 5 - Valores de média e desvio-padrão da viabilidade celular (%) e resultados do teste de Tukey para o fator tratamento.....	59
Tabela 6 - Resultado do teste ANOVA 1 fator tratamento com 24 horas de ressecamento.....	60
Tabela 7 - Valores de média (%) e desvio-padrão da viabilidade celular e resultados do teste de Tukey para o fator tratamento.....	60

França M. Influência do ressecamento da superfície radicular, do tratamento com EDTA e ácido Hialurônico na viabilidade e expressão de citocinas inflamatórias de fibroblastos do ligamento periodontal. [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2017.

RESUMO

O momento ideal para o reimplante de um dente avulsionado é imediatamente após a avulsão, no entanto, isso nem sempre é possível. Uma série de fatores influenciam na viabilidade das células do ligamento periodontal (PDL) contribuindo para acelerar ou minimizar a ocorrência da reabsorção radicular ou anquilose, consequências mais frequentes dos reimplantes. Um destes fatores é o período extra-oral e o tratamento da superfície radicular. O EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) a 17% e o ácido hialurônico (AH) são utilizados para tratar a superfície radicular, visando menor ocorrência de reabsorção inflamatória e por substituição. Sendo assim, os objetivos deste estudo foram: a) avaliar a viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal (PDLF) em contato com discos radiculares submetidos ou não ao ressecamento de superfície por diferentes tempos e tratados com EDTA e/ou AH; b) quantificar as citocinas inflamatórias IL-6, IL-8, IL-1 β e TNF- α expressas por PDLF; c) observar a adesão de PDLF na superfície dos discos radiculares tratados. Foram obtidos 108 discos de dentina e cimento da superfície radicular de dentes bovinos, com 4,5 mm de diâmetro, que foram previamente submetidos a dissolução do ligamento periodontal em solução de hipoclorito de sódio 1% por 15 min. Em seguida os discos foram esterilizados em concentrações decrescentes de álcool (100%,90%,80% e 70%). Os espécimes foram submetidos ou não ao ressecamento radicular por 1h ou 24h e tratados com EDTA associado ou não ao ácido hialurônico, colocados em placas de 96 poços onde foram semeadas células de culturas primárias de PDLF, que ficaram em contato com os discos por 48 h. A viabilidade celular na superfície dos discos foi avaliada através do ensaio de XTT. A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para verificar a adesão de PDLF à superfície dos discos. A detecção e quantificação das citocinas foi realizada pelo teste ELISA. Os dados foram submetidos à análise estatística pelo teste ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). A maior média foi apresentada no grupo sem ressecamento para o tratamento EDTA+AH (148,39), que diferiu significativamente dos grupos controle e EDTA. No grupo ressecamento 1 h EDTA+AH (144,91) foi diferente dos demais. Para ressecamento 24h, verificou-se que o grupo EDTA+AH diferiu do grupo controle. Não houve modificações na expressão das citocinas IL-6, IL-8, IL-1 β e TNF- α quando foi acrescentado os tratamentos propostos. A IL-6 mostrou uma diminuição quando em contato com AH no período de 24h. Foi observada pelo MEV adesão de PDLF na superfície de todos os discos tratados e em todos os períodos analisados. Conclui-se que o ácido hialurônico é uma alternativa de tratamento para casos de dentes avulsionados já que mostrou seu papel promovendo adesão e aumento da viabilidade.

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

França MCM. Influence of root surface dryness and treatment with EDTA and Hyaluronic acid on the viability and expression of inflammatory cytokines of periodontal ligament fibroblasts. [thesis]. São José dos Campos (SP): Paulista State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2017.

ABSTRACT

The ideal time for reimplantation of an avulsed tooth is immediately after avulsion, however, this is not always possible. A number of factors influence the viability of the cells of the periodontal ligament (PDL) contributing to accelerate or minimize the occurrence of root resorption or ankylosis, more frequent consequences of reimplantation. One of these factors is the extra-oral period and root surface treatment. EDTA (17% ethylenediaminetetraacetic acid) and hyaluronic acid (HA) are used to treat the root surface, aiming for a lower occurrence of inflammatory resorption and replacement. Thus, the objectives of this study were: a) to evaluate the viability of periodontal ligament fibroblasts (PDLF) in contact with root disks submitted to surface dryness at different times and treated with EDTA and / or AH; b) quantify the inflammatory cytokines IL-6, IL-8, IL-1 β and TNF- α expressed by PDLF; c) observe the adhesion of PDLF on the surface of the treated root discs. 108 dentin and cementum disks were obtained from the root surface of bovine teeth, 4.5 mm in diameter, which were previously submitted to dissolution of the periodontal ligament in 1% sodium hypochlorite solution for 15 min. Then the disks were sterilized in decreasing concentrations of alcohol (100%, 90%, 80% and 70%). The specimens were submitted to root resection for 1 h or 24 h and treated with EDTA, whether or not associated with hyaluronic acid, placed in 96-well plates where cells from PDLF primary cultures were seeded and left in contact with the discs for 48 h. Cell viability at disc surfaces was assessed by the XTT assay. Scanning electron microscopy was used to verify the adhesion of PDLF to the disc surface. Detection and quantification of cytokines was performed by ELISA. Data were submitted to statistical analysis by the ANOVA and Tukey test ($p < 0.05$). The highest mean was presented in the non-dry group for EDTA + AH treatment (148,39), which differed significantly from the control and EDTA groups. In the dryness group 1 h EDTA + AH (144.91) was different from the others. For dryness 24 h, it was found that the EDTA + AH group differed from the control group. There were no changes in the expression of cytokines IL-6, IL-8, IL-1 β and TNF- α when the proposed treatments were added. IL-6 showed a decrease when in contact with HA in the 24-hour period. It was observed by the MEV adhesion of PDLF on the surface of all treated discs and in all periods analyzed. It is concluded that hyaluronic acid is an alternative treatment for cases of avulsed teeth since it showed its role promoting adhesion and increased viability.

Keywords: Dental avulsion. Ethylenediaminetetraacetic acid. Enzyme immunoabsorption assay.

1 INTRODUÇÃO

Dentre as lesões traumáticas que podem ocorrer na dentição permanente, a avulsão dentária é o tipo mais grave, pois provoca danos em várias estruturas responsáveis pelo suporte do dente no seu alvéolo (Lopes, Siqueira Jr., 2010). A avulsão resulta no deslocamento completo do dente de seu alvéolo, com o rompimento do ligamento periodontal, acarretando danos ao cemento e as células aderidas a ele (Andreasen, 1981; Flores et al., 2001).

De acordo com Bastone (2000) a avulsão corresponde de 1 a 16% das lesões e ocorre mais frequentemente entre as idades de 7 a 14 anos, afetando principalmente os incisivos centrais superiores. É importante que o cirurgião-dentista tenha conhecimento dos protocolos de tratamento para dentes traumatizados, a fim de que se realize o tratamento mais rápido possível e de maneira adequada, aumentando a chance de sucesso destes casos (Trope, 2002).

A Associação Internacional de Traumatologia Dental (IADT) propõe um guia atualizado em 2012 para orientar os profissionais a adotar o melhor tratamento de acordo com as condições presentes na situação traumática. A escolha do tratamento está relacionada à maturidade da raiz (ápice aberto ou fechado) e à condição das células do ligamento periodontal. A condição das células depende do tipo de armazenamento deste dente e o tempo que ficou fora da boca até o seu reimplante. Após um tempo seco de 60 min ou mais, todas as células PDL não são viáveis. A fim de diminuir a substituição óssea do dente, a superfície radicular deve ser tratada com solução de fluoreto de sódio 2 % por 20 min antes do reimplante.

Idealmente, um dente que sofreu avulsão, deve ser reimplantado imediatamente, mas em muitos casos isso não acontece, devido à falta de conhecimento de pais e responsáveis de como proceder diante da urgência, seja de como armazenar este dente ou o período que deva procurar o cirurgião-dentista.

Diante da impossibilidade de reimplante imediato, o dente deve ser mantido em meio úmido, para a manutenção da vitalidade das células do ligamento periodontal

(Flores et al., 2001). Os principais meios de armazenamento até hoje utilizados são: a Solução Salina Balanceada de Hank's (SSBH), saliva, leite e água (Sigalas et al., 2004). O meio de armazenamento ideal deve ter osmolaridade fisiológica, pH adequado e nutrientes para permitir a sobrevivência das células do LP, mas até o momento não há evidências suficientes para determinar o melhor meio de armazenamento para se conseguir um reimplante bem-sucedido (Longo et al., 2017).

Portanto, o reimplante de um dente avulsionado deve, sempre que possível, ser imediato evitando o ressecamento da superfície radicular e assim aumentando as possibilidades das células do ligamento periodontal se repararem (Andreasen, 1981; Soder et al. 1977), uma vez que irão manter a sua viabilidade, favorecendo a regeneração das mesmas (Trope, 1998).

Quando há demora no reimplante com ressecamento excessivo da superfície radicular, as células do ligamento periodontal serão danificadas o que irá provocar uma resposta inflamatória difusa no tecido em contato com a superfície radicular (Trope et al., 2011). Em um primeiro momento, áreas de necrose, acúmulo de sangue e um exsudato inflamatório se formam entre as fibras do ligamento periodontal e no espaço ocupado por ele (Saito et al., 2011).

Devido a essa resposta inflamatória os cementoblastos se dirigem mais lentamente para a superfície radicular podendo não cobrir totalmente esta região, permitindo que células ósseas cheguem a estas áreas promovendo a anquilose e, possivelmente, pode se iniciar uma reabsorção substitutiva pelo processo de remodelação óssea (Andreasen, 1966; Trope, 1998; Lopes e Siqueira Jr. 2010; Trope et al., 2011).

Além disso, as células do ligamento periodontal podem sofrer necrose e, nestes casos, o tecido de granulação pode ser substituído por tecido ósseo e iniciar o processo de reabsorção, que na presença de microrganismos pode se tornar uma reação inflamatória (Panzarini et al., 2008).

Sendo assim, no reimplante os fatores mais importantes para acelerar ou minimizar a ocorrência da reabsorção radicular ou anquilose são o período de exposição extra-oral e o meio de armazenamento do dente avulsionado (Mori et al., 2007).

Quanto ao tempo extra-oral do dente avulsionado, se este for maior que 15 a 20 min sem umidade, as células do ligamento periodontal provavelmente não estarão mais viáveis e a raiz deve ser tratada para minimizar as prováveis consequências deste ressecamento (Trope, 2011). Para limitar ou prevenir a reabsorção radicular e promover o reparo dos tecidos, o dente submetido ao reimplante tardio deve receber um tratamento na superfície radicular e iniciar a terapia endodôntica (Mori et al., 2013).

O sal trissódico de EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) é um quelante com propriedades lubrificantes (Çalt, Serper, 2002), que leva molhabilidade para a superfície dentinária e vem sendo estudado como promotor da adesão celular sobre superfícies de raízes dentárias nos processos de avulsão e reimplante tardio simulados (Pang et al., 2014).

O EDTA pode ser usado na superfície radicular na tentativa de reestabelecer a biocompatibilidade das raízes atuando como agente condicionador (Prasad et al., 2012), e também auxilia na liberação de fatores de crescimento derivados da dentina, capazes de induzir a proliferação, a diferenciação e a sobrevivência celular (Roberts-Clark, Smith, 2000)

Vários biomateriais naturais e sintéticos também têm sido investigados para o uso na regeneração dos tecidos que sofreram alguma injúria e que possuem baixo potencial de recuperação com sequelas previsíveis, tais como scaffolds, componentes da matriz extracelular, hidrogéis e biocerâmicos (Galler et al., 2011; Mooney et al., 1996; Bohl et al., 1998; Srisuwan et al., 2013; Huang et al., 2010; Prescott et al., 2008).

Um biomaterial promissor no campo da engenharia de tecidos e medicina regenerativa é o ácido hialurônico (HA), também chamado de hialuronano e seus derivados, obtidos por esterificação do HA com diferentes álcoois (Brun et al., 2008; You et al., 2014). Os polímeros biodegradáveis à base de ácido hialurônico têm sido utilizados com êxito nos processos de reparação óssea e nas células estaminais mesenquimais em estudos *in vitro* e *in vivo* (Gardin et al., 2011; Brun et al., 1999; Zavan et al., 2005) e em aplicações clínicas (Brun et al., 2008; You et al., 2014).

O hialuronano é uma molécula do tecido conjuntivo e tem papel fundamental em muitos processos biológicos, tais como no equilíbrio de água, no reconhecimento de células embrionárias, desenvolvimento e cicatrização de feridas (Prescott et al.,

2008). O ácido hialurônico tem funções estruturais e fisiológicas dentro dos tecidos, incluindo a interação de fator de crescimento, regulação da pressão osmótica e lubrificação do tecido, o que ajuda a manter a integridade estrutural e homeostática (Gocmen et al., 2015)

Além disso, o ácido hialurônico é rapidamente convertido no corpo em hialuronidase, com meia-vida nos tecidos variando de horas a dias (Vindigni et al., 2009). Experiências *in vivo* sugerem que o hialuronano sozinho ou em combinação com outros biomateriais poderia proporcionar um ambiente adequado para a indução e formação de dentina reparadora através das células estaminais mesenquimais diferenciadas (Sasaki, Kawamata-Kido, 1995; Kuo et al., 2008; Inuyama et al., 2010; Bogovic et al., 2011).

O ácido hialurônico (AH) pode ser empregado em scaffold devido à sua ação na funcionalidade da matriz extracelular. Produzido também pelos fibroblastos, o AH contribui significativamente na hidrodinâmica tecidual, na migração celular e na sua proliferação (Bansal et al., 2010). Em um estudo de Takeda et al. (2011) observaram que scaffolds de ácido hialurônico empregados em dentes de cachorros, foram promotores da adesão e proliferação de fibroblastos do ligamento periodontal. Assim, devido a estas propriedades, o uso do ácido hialurônico pode ser uma alternativa para o tratamento da superfície radicular antes do reimplante.

Imediatamente após o reimplante de um dente que sofreu avulsão, uma resposta inflamatória ocorre como parte da cura do periodonto e são liberadas citocinas inflamatórias nesta região. Estas citocinas correspondem à uma família de peptídeos, que são pequenas sequências de aminoácidos capazes de interagir com receptores específicos das membranas celulares (Consolaro, 2009). Influenciam a atividade, diferenciação, proliferação e sobrevivência da célula, assim como atenuam ou aumentam a resposta inflamatória (Oliveira et al., 2011).

A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina com atuação tanto na resposta imune inata como na adaptativa (Gomes et al., 2009). É um importante marcador inflamatório, e está envolvida em uma série de atividades imunológicas, em especial a síntese de substâncias de fase aguda pelo fígado (Garcia et al., 2002; Gomes et al., 2009). Também é um importante mediador da febre. Mantém a homeostase tecidual,

e é capaz de mediar a resposta aguda, além de ser um fator de crescimento hematopoiético, induz a diferenciação neuronal das células e contribui com a remodelação óssea (Lyngstadaas et al., 2001). A IL-6 regula as respostas imunes em locais da inflamação e possui atividade autocrina / paracrina estimulando a formação de osteoclastos e a atividade de reabsorção óssea de osteoclastos pré-formados (Okada et al., 1997; Kurihara et al., 1990).

Já a interleucina 8 (IL-8) é uma citocina pró-inflamatória que participa da defesa do hospedeiro, bem como em vários graus de danos ao tecido, sendo muito importante na resposta inflamatória devido à sua ação quimiotática para neutrófilos, mediando a resposta inflamatória, e atuando como fator angiogênico. (Nasser et al., 2009; Baek et al., 2013; Cvikl et al., 2015). É produzida principalmente por queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais e macrófagos em resposta às bactérias periodontais e componentes bacterianos. Atua direcionando neutrófilos polimorfonucleares para o local da infecção, o que resulta na produção de mais citocinas, contribuindo para a progressão da doença (Sahingur, Yeudall, 2015).

O agrupamento de genes da interleucina-1 (IL1) está localizado no cromossomo 2 humano e contém genes que codificam citocinas pró-inflamatórias que incluem IL-1 α e IL-1 β , bem como o antagonista anti-inflamatório do receptor de IL-1 da citocina (IL-1RA). Embora a IL-1 α e IL-1 β sejam produtos de genes distintos, eles reconhecem os mesmos receptores da superfície celular e compartilham um amplo espectro de atividades biológicas que regulam as funções da resposta imune inata e adaptativa (Dinarello, 1991).

A IL-1 β é conhecida por ser uma das citocinas pró-inflamatórias relacionadas à reabsorção óssea osteoclástica (Lang et al., 2000; Bastos et al., 2017). É especialmente importante porque é liberada principalmente por monócitos ativados e participa da resposta da fase aguda na indução da reabsorção óssea. IL-1 β também é considerada um poderoso indutor da produção de IL-6 (Uematsu et al., 1996). É expressa pelos fibroblastos do ligamento periodontal, e capaz de mediar o processo de defesa do hospedeiro, como por exemplo, a resposta inflamatória e celular a uma injúria (Lin et al., 2015). Exacerba a resposta inflamatória e promove a progressão para estágios mais avançados da doença, assim como causa a perda da rede de fibra de colágeno em torno do infiltrado inflamatório devido à ativação do sistema imune

local. Na presença da IL-1 β , as células do ligamento periodontal são capazes de mudar suas características fenotípicas de forma transitória e passam a mediar processos catabólicos como a reabsorção óssea (Kanzaki et al., 2002).

O fator de necrose tumoral- α (TNF- α) refere-se a um grupo de citocinas capaz de provocar a morte de células (apoptose) e que possuem uma vasta gama de ações pró-inflamatórias. O TNF- α é secretado principalmente por macrófagos e possui em sua família o fator de necrose tumoral alfa e beta (TNF α e TNF β) que também promovem reabsorção óssea atuando principalmente na osteoclastogênese, sendo capaz de, coordenadamente, estimular a indução de IL-1 β e diminuir os efeitos da mesma (Lin et al., 2015). Responsável pela hiperalgesia inflamatória e neuropática, estimula a proliferação de linfócitos-T e fibroblastos.

Por isso, o processo inflamatório que acontece após o reimplante de dentes previamente tratados tem gerado questionamentos, a cerca de quais mediadores químicos inflamatórios são liberados e qual o papel dos mesmos na resposta inflamatória.

O processo de cura dos tecidos ao redor de um dente reimplantado tardiamente pode ser avaliado através da análise histomorfométrica e imunohistoquímica, que se complementam na busca pela informação precisa de expressão e localização de cada proteína envolvida na cura do ligamento periodontal (Saito et al., 2011; Carvalho et al., 2012).

Para avaliar a viabilidade das células que se aderem a superfície radicular após reimplante de dentes submetidos a diferentes tratamentos de superfície e avaliar a adesão desta célula à superfície radicular, utilizam-se testes de sobrevivência e viabilidade celular e análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV), respectivamente (Mori et al., 2007; Palaiologou et al., 2001).

Sendo assim, este estudo pretende avaliar a eficácia do tratamento da superfície radicular de dentes avulsionados com EDTA 17% por 5 min concomitante ao uso do ácido hialurônico nos diferentes períodos de ressecamento propostos, quanto a viabilidade de fibroblastos da superfície radicular através de teste de XTT; a quantificação das citocinas IL-6, IL-8, IL-1 β e TNF- α pelo ensaio ELISA e em caráter ilustrativo a adesão de fibroblastos na superfície radicular por MEV. A hipótese do

estudo é a de que o tratamento da superfície radicular com EDTA 17% por 5 min concomitante ao uso do ácido hialurônico aumentem a viabilidade celular dos fibroblastos do ligamento periodontal, permitindo a regeneração dos mesmos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tratamento de dentes avulsionados

Uma das etapas do tratamento da superfície radicular previamente ao reimplante dental tardio é a remoção do ligamento periodontal radicular necrótico. Isto pode ser realizado quer mecanicamente por raspagem com curetas (Nyman et al., 1985; Zervas et al., 1991), lâmina de bisturi (Duggal et al., 1994, Panzarini et al., 2014b), taça de borracha, polimento com pasta de pedra-pomes / água (Kenny et al., 2000), broca diamantada e disco de lixa (Selvig et al., 1990;), ou quimicamente com hipoclorito de sódio (Sonoda et al., 2008; Kanno et al., 2001; Panzarini et al., 2005; Lustrosa-Pereira et al., 2006). Alguns autores não realizam esse procedimento e preferem aplicar as substâncias diretamente no ligamento necrosado (Cvek et al., 1990; Selvig et al., 1992; McDonald, Strassler, 1999).

Além disso, muitas substâncias vêm sendo utilizadas para o tratamento da superfície radicular de dentes reimplantados em uma tentativa de aumentar a sua taxa de retenção, com o uso de formol, soluções ácidas (tais como ácido cítrico, ácido clorídrico, flúor fosfato acidulado), substâncias alcalinas (tais como hidróxido de cálcio e hipoclorito de sódio), antibióticos (tais como a tetraciclina e rifacin), combinação de antibiótico / corticosteróide, corticosteróides, o alendronato, a vitamina C, inibidores da anidrase carbônica (acetazolamida), proteínas do esmalte dental e o ácido hialurônico (Panzarini et al., 2008).

Outra substância capaz de promover a adesão celular sobre a superfície da raiz dentária nos processos de avulsão e reimplante tardio é o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) através da liberação de fatores de crescimento derivados da dentina capazes de induzir a proliferação, a diferenciação e a sobrevivência celular (Roberts-Clark, Smith, 2000). Pode ser usado na superfície radicular na tentativa de reestabelecer a biocompatibilidade das raízes atuando como agentes condicionadores (Prasad et al., 2012).

2.1.1 Uso do ácido hialurônico

Em 2011, Bogovic et al. tiveram como objetivo investigar os efeitos do ácido hialurônico sobre a proliferação de odontoblastos e fibroblastos avaliando o seu potencial como material para capeamento direto da polpa. O estudo foi realizado com ratos adultos Sprague-Dawley que tiveram os dentes incisivos extraídos e suas coroas seccionadas em fatias e posteriormente incubadas numa solução com collagenase e protease. Foram testados um adesivo de dentina polimerizada (Excite®), o hidróxido de cálcio preparado (ApexCal®), o ácido hialurônico (Gengigel Prof®), e um grupo controle. As amostras contendo odontoblastos e fibroblastos foram então coradas com solução de laranja de acridina e brometo de etídio e levadas ao Microscópio Fluorescente. Diferenças na coloração permitiram a contagem de células em apoptose (cromatina condensada era visível) e células em necrose (células vermelhas fluorescentes). Os autores observaram que em comparação com o controle, o número de fibroblastos e odontoblastos foi maior na cultura tratada com ácido hialurônico e menor nas culturas tratadas com o adesivo de dentina e o hidróxido de cálcio, mas não foi estatisticamente significativa. A viabilidade foi maior nas culturas tratada com ácido hialurônico e o número de células em apoptose e necrose foi menor do que no controle. Portanto, os autores observaram que o ácido hialurônico parece estimular a vascularização, provavelmente através de ação direta em células endoteliais e indiretamente criando condições favorecendo a mineralização. Estimula migração de diferentes tipos de células para a área lesada e sua proliferação e diferenciação em células tipo odontoblastos.

Também na tentativa de avaliar clinicamente os efeitos do gel de ácido hialurônico aplicado em conjunto com a cirurgia periodontal Fawzy El-Sayed et al. (2012) selecionaram 14 pacientes com periodontite crônica (≥ 3 mm) e com valores de profundidade de sondagem > 5 mm. Uma terapia periodontal inicial não cirúrgica foi realizada na região supra e sub-gengival da boca toda e também raspagem e alisamento radicular (RAR). Após os pacientes foram aleatoriamente distribuídos para serem tratados com 0,8% de gel hialuronano (teste) ou gel de placebo (controle). O nível clínico de inserção (NCI), profundidade de sondagem (PS), recessão gengival (RG), índice de placa (IP) e sangramento a sondagem (SS) foram avaliados

imediatamente, 3 e 6 meses. Os autores observaram que os pacientes que receberam o tratamento com o ácido hialurônico apresentaram maior ganho em NCI e redução nos valores de RG. Não foi observada diferença estatística em relação à PS, SS, e IP. Os autores concluíram que a aplicação de gel de ácido hialurônico em conjunto com cirurgia periodontal parece favorecer significativamente o resultado cirúrgico do periodonto em termos de ganhos em nível clínico de inserção, bem como uma redução nos valores da recessão gingival.

Saminathan et al. (2013), semearam células do ligamento periodontal (PDL) em cultura tridimensional composta por hidrogel de ácido hialuronano. Foram cultivadas com e sem fator de crescimento de tecido conjuntivo (FGTC) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF-2) em culturas estacionárias e culturas mecanicamente ativas. Estudos comprovam que o fator de crescimento FGTC é mitogênico por fibroblastos e capaz de direcionar a diferenciação de células progenitoras do ligamento periodontal e células mesenquimais e que o FGF-2 é amitogênico. Parece que a produção endógena de fatores de crescimento pelas células do ligamento seria suficiente para promover o crescimento de fibroblastos. Foi verificado que o estresse mecânico não permite a proliferação celular como anteriormente relatado tanto para células epiteliais como para osteoblastos. Os autores ainda observaram o número de célula e a viabilidade por Microscopia confocal de varredura a laser; a proliferação celular através do ensaio MTS; a expressão de 18 genes utilizando RT-PCR em tempo real; e as matrizes de metaloproteinases (MMPs) em sobrenadantes de culturas ativadas mecanicamente com ensaios imuno-absorventes ligados à enzima de actina e vinculina. Foi observado que as células se organizaram em uma bicamada após 7 dias. As células apoptóticas permaneceram constantes em aproximadamente 5% do total. A proliferação celular foi estimulada por FGTC / FGF-2 em culturas estacionárias, mas os valores de quantidade relativa sugeriram efeitos modestos sobre a expressão gênica.

Em 2014, Rajan et al. avaliaram o efeito adjunto da aplicação local de gel de ácido hialurônico após raspagem e alisamento radicular (RAR) em pacientes com periodontite crônica. Foram avaliados 33 pacientes após a RAR da boca toda. Os pacientes foram divididos em grupo A (grupo teste que recebeu o gel de ácido hialurônico 0,2%) sendo aplicado imediatamente após RAR e uma semana após a terapia e grupo B (grupo controle) tratados somente com RAR. O sangramento na

sondagem (SS), a profundidade de sondagem (PS) e o nível clínico de inserção (NCI) foram registrados em 4 semanas e 12 semanas. Observou-se redução significativa nos pontos de SS em ambos os grupos em 12 semanas. O grupo A apresentou maior redução no SS. No grupo B, a PS reduziu em 12 semanas, o que foi estatisticamente significativo. As medições do NCI mostraram diferença significativa entre os grupos após 12 semanas de terapia. Os autores concluíram que ácido hialurônico (A) tem um efeito benéfico na saúde periodontal em pacientes com periodontite crônica. AH parece ser um material adequado como coadjuvante na RAR em pacientes com periodontite crônica.

Em um estudo de 2015, Gocmen et al. mediram a eficácia do ácido hialurônico na cicatrização de feridas num estudo bioquímico e histológico, após extração de terceiros molares. Compararam os níveis de glutathione (GSH) e peroxidação lipídica (LPO), nível de dor e trismo e a presença de leucócitos, colágeno e angiogênese entre grupo controle e ácido hialurônico. Os pacientes foram divididos aleatoriamente entre o grupo que recebeu a aplicação de 0,8% de gel do ácido hialurônico nas bordas das feridas logo após a extração e o grupo controle que não recebeu tratamento. A resposta inflamatória, o estresse oxidativo, dor e trismo foram registrados imediatamente após a cirurgia (T0) e comparado com os resultados após uma semana (T1). Foram obtidas amostras de tecido da borda da região da exodontia dos terceiros molares imediatamente e após uma semana da cirurgia. Os espécimes obtidos para avaliação histológica foram embutidos em blocos de parafina, seccionados e corados com hematoxilina e eosina e mancha de tricromo de Masson para exame sob microscópio invertido de luz. A classificação da infiltração inflamatória foi estabelecida selecionando aleatoriamente e contando os campos com infiltração de leucócitos, angiogênese e fibrose (deposição de colágeno). Os autores não encontraram diferença entre os grupos quanto à distribuição de leucócitos, angiogênese e colágeno, GSH e LPO em T0. Os valores de GSH, LPO e colágeno era o mesmo em T1. Houve diferença estatisticamente significativa na infiltração de leucócitos e a angiogênese entre os grupos em T1. A infiltração de leucócitos no grupo AH foi mais leve do que no grupo controle. A angiogênese no grupo controle foi menor do que o grupo AH. Não houve diferenças estatisticamente significantes na presença de dor entre os dois grupos. Houve uma diminuição significativa da presença de dor para ambos os grupos após 1 semana. No 7º dia de pós-operatório, quase todos os pacientes recuperaram-se do

trismo e não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos.

Na tentativa de se restabelecer a arquitetura e a função do ligamento periodontal, além de se evitar a anquilose, evitando ou modulando a reabsorção por substituição, Moreira (2016) avaliou a eficácia do tratamento de discos da superfície vestibular de raízes de dentes bovinos, com EDTA 17%, com Emdogain®, com ácido hialurônico e com colágeno, através de testes de viabilidade celular, quantificação das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α por ensaio ELISA, além da ilustração por microscopia eletrônica de varredura da adesão dos fibroblastos sobre os discos de dentina. Foram cortados 155 discos de dentina, com 4,5 mm de diâmetro, da face vestibular da superfície radicular de dentes bovinos, previamente raspados ou não com cureta periodontal. Os discos foram regularizados, limpos e autoclavados. Os espécimes foram tratados com as substâncias preconizadas e colocados em placas de 96 poços onde foram semeadas células de culturas primárias de fibroblastos humanos de ligamento periodontal, que ficaram em contato com os discos por 48 h. A sobrevivência e a viabilidade celular na superfície dos discos foram avaliadas através do ensaio de XTT. A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para verificar a adesão de fibroblastos à superfície dos discos. A detecção e quantificação das citocinas foram realizadas pelo teste ELISA. Os resultados obtidos mostraram que o uso de EDTA 17% por 5 min sem agitação foi mais eficaz que os outros protocolos e aliado ao ácido hialurônico, foi menos citotóxico promovendo melhor viabilidade celular. Não foi possível assegurar a visualização dos fibroblastos em microscopia eletrônica de varredura. Quanto ao ensaio de ELISA, houve expressão das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-8 (citocinas pró-inflamatórias), porém houve diferença estatisticamente significativa entre a IL-6 e a IL-8. Sendo assim, os autores concluíram que o EDTA 17% por 5 min sem agitação e o ácido hialurônico apresentaram menor índice de citotoxicidade aos fibroblastos do ligamento periodontal, porém houve resposta inflamatória pela expressão de IL-6 e IL-8.

2.1.2 Aplicação de EDTA

A fim de investigar o padrão de cicatrização periodontal de defeitos do tipo deiscência seguindo diferentes modalidades químicas de condicionamento radicular Zandim et al. (2013) avaliaram defeitos medindo 3 mm de largura e 5 mm de altura, que foram criados cirurgicamente com instrumentos de mão nas raízes mesiais da maxila de seis dentes de cães. Após a acumulação de placa dental, os defeitos foram tratados com solução salina estéril (grupo controle) ou com condicionamento químico: ácido cítrico (grupo AC), ácido etilenodiaminotetracético (grupo EDTA), tetraciclina (grupo TTC), ácido cítrico +tetraciclina (grupo AC + TTC) ou tetraciclina + ácido cítrico (grupo TTC + AC). Após 3 meses de tratamento, os seguintes parâmetros clínicos foram avaliados: presença de placa visível, presença de sangramento gengival, profundidade de sondagem (PD), sangramento na sondagem, nível gengival marginal (MGL) e nível clínico de inserção (NCI). O condicionamento do ácido cítrico foi realizado pela aposição de algodão esterilizado embebido com uma solução aquosa saturada durante 3 min. Histologicamente as lâminas foram processadas e uma histometria assistida por computador foi utilizada para avaliar a formação de novo cemento, osso e a migração epitelial apical. A resposta de cura foi favorável em todos os grupos. Não pode ser observado supuração, formação de abscessos ou outra complicação clínica. Não foram detectadas diferenças significativas dentro e entre os grupos em relação aos parâmetros clínicos MGL, PD e CAL. Todos os grupos de tratamentos produziram melhorias significativas em termos de redução de PD E CAL. Foi observado novo cemento em todos os espécimes, e cementoblastos ao longo da superfície do cemento recém-formado. A migração apical do epitélio foi limitada ao terço coronário do defeito em todos os grupos de tratamento. Um tecido com fibras colágenas em uma disposição regular foi presente em todos os grupos, e um infiltrado inflamatório foi encontrado no grupo AC. O ligamento periodontal estava presente entre o novo cemento e o novo osso em todos os grupos. Nenhuma área de reabsorção e anquilose dentoalveolar estava presente. Os autores concluíram que todos os tratamentos renderam melhorias significativas em termos de profundidade de sondagem e ganho de nível clínico de inserção, no entanto, sem diferenças

significativas entre os grupos. A maior quantidade de cimento novo foi observada no grupo EDTA, enquanto menor quantidade de osso novo foi observada no grupo TTC.

Pang et al. (2014) avaliaram o efeito do EDTA na diferenciação de células da polpa (DPSCs). Também investigaram se componentes liberados da dentina tratada com EDTA são capazes de modificarem as DPSCs. As células foram obtidas a partir de terceiros molares humanos e a análise realizada através da citometria de fluxo. As DPSCs foram semeadas em discos de dentina tratados com EDTA 17%. Após 3 dias de cultura, foi avaliada a adesão celular e a expressão de fibronectina usando o PCR em tempo real e a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Após 21 dias de cultura, a expressão e a diferenciação dos genes foram investigados por PCR e calcificação foi observada usando a coloração por alizarin vermelho. As DPSCs foram cultivadas com ou sem contato direto com a superfície de dentina tratada com EDTA. O estudo identificou que após 3 dias de cultura, tanto a densidade celular com o nível de expressão da fibronectina foram significativamente maiores no grupo da dentina tratada com EDTA. Após 3 semanas, as DPSCs sobre os discos de dentina tratados com EDTA mostraram maiores níveis de expressão de sialofosfoproteína dentinária e proteína de matriz de dentina 1, enquanto as DPSCs cultivadas sem contato direto com as superfícies de dentina tratadas com EDTA não exibiram essas descobertas. Os resultados mostraram que o EDTA induziu a ligação celular e diferenciação odontoblástica / osteoblástica, fato observado apenas no grupo em que as DPSCs foram colocados em contato direto com as superfícies de dentina tratadas com EDTA. O estudo sugere que o EDTA é benéfico para alcançando resultados bem-sucedidos na endodontia regenerativa.

Zhu et al. (2015) investigaram se a regeneração do ligamento periodontal (PDL) poderia ser promovido pelo fator-1 alfa derivado das células do estroma (SDF1), que é uma proteína de quimiocinas presente em vários tipos de tecidos e células, dos quais os leucócitos são ativados e geralmente são induzidos por estímulos pró-inflamatórios, como lipopolisacarídeos, TNF ou IL-1 e também pela proteína óssea morfogenética 7 (BMP7) capaz de induzir a transformação de células mesenquimais em cartilagem e osso. Os dentes premolares mandibulares de cães da raça beagle foram extraídos e deixados ao ar livre por 2 h, em seguida o ligamento periodontal foi removido com auxílio de gaze úmida. Vinte e quatro raízes foram divididas em dois grupos (n = 12 / grupo). As raízes do Grupo A foram tratadas com EDTA 17 % durante

24 h para conseguir a desmineralização e, em seguida, revestido com solução de colágeno suplementada com SDF1 e BMP7. As raízes do Grupo B foram tratadas de forma semelhante, exceto sendo revestidas com uma solução de colágeno prístina. A superfície da raiz antes do tratamento com EDTA mostrou-se compacta e sem nenhum poro. No entanto, após o revestimento com citocina parece que essa micro-morfologia foi coberta e não pode ser vista com clareza. No grupo A verificaram que aos 6 meses após o reimplante, o espaço intersticial entre o osso alveolar e a raiz já estava preenchido com um alto teor de tecido conjuntivo parecido com PDL recém-formado. Um tecido semelhante ao PDL composto de células em forma de fuso alinhadas com densas fibras de colágeno e capilares foi formado sendo considerado a cura completa. Foi encontrada uma alta incidência de PDL em 42% das amostras do Grupo A. No entanto, foi observado algumas amostras sem PDL, anquilose radicular e reabsorção de substituição, bem como reabsorção inflamatória nas raízes reimplantadas do Grupo B. Pode-se confirmar que os dentes avulsionados podem ser reimplantados com sucesso, mesmo em reimplante tardio.

Em 2017, Tartari et al. tiveram como o objetivo de investigar os efeitos de agentes descalcificantes aplicando sozinhos ou em combinação com hipoclorito de sódio (NaOCl) nos componentes orgânico e inorgânico da dentina usando espectrofotometro (ATR-FTIR). Foram realizadas fatias de dentina de dentes bovinos e submetidos aos seguintes tratamentos: solução salina a 0,9%, ácido etidronico (HEDP) 9% e 18%, EDTA tetrasódio 5% e (EDTANa₄) a 10%, EDTA trissódico (EDTAHNa₃) 17% e ácido peracético (PAA) 0,5% e 2,0%, por 0,5-10 min. E nas combinações: G1 – mistura NaOCl 5%+ HEDP 18% (5 e 10 min); G2 – mistura NaOCl 5% + EDTANa₄ 10% (5 e 10 min); G2 NaOCl 2,5% (5 min) + EDTAHNa₃ 17% (1 min); G3 – NaOCl 2,5% (5 min) + PAA 0,5% (1 min); G4 -NaOCl 2,5% (5 min) + HEDP 9% (5 min). Os espécimes do G2, G3 e G4 receberam aplicação final de NaOCl 2,5% durante 0,5-10 min. Foram verificadas as taxas de amida III/fosfato e de carbonato/fosfato coletados dos espécimes de dentina antes e depois da imersão nas soluções. Os autores concluíram que para um mesmo agente de descalcificação, quanto maior a concentração e o tempo de imersão, maior foi a remoção de fosfato, expondo a matriz de colágeno e conseqüentemente causando o aumento na taxa de amida III /fosfato. No entanto, diferenças significativas foram encontradas apenas entre as duas concentrações de PAA. PAA causou maiores aumentos da taxa de

amida III/fosfato, seguida de EDTAHNa₃, EDTANa₄ e HEDP, e que foi mantido nas combinações com NaOCl. Esta proporção foi significativamente reduzida em G1 e não alterado em G2. Devido à degradação do colágeno, a taxa de amida III / fosfato reduziu significativamente após o uso de NaOCl em G3, G4 e G5. NaOCl levou aproximadamente 0,5 s para desproteinar o colágeno da matriz exposta após a remoção de fosfato pelo EDTAHNa₃ e PAA. O carbonato da dentina foi removido mais rapidamente que o fosfato por todos os agentes que foram utilizados sozinhos e em G3, G4 e G5. Nas combinações com NaOCl, o último irrigante usado foi responsável por descalcificar a amina III / fosfato e carbonato / fosfato. HEDP e EDTANa₄ causaram menor desmineralização enquanto EDTAHNa₃ e PAA a maior. Tanto o tempo como a concentração dos agentes foram importantes para o estudo. NaOCl degradou a dentina da matriz orgânica mais rapidamente. As combinações do NaOCl e descalcificantes podem ser usadas para criar superfícies dentinárias com composições variáveis para interação com selantes endodônticos.

2.1.3 Remoção do ligamento periodontal e tempo de ressecamento da superfície radicular

Em reimplante dentário tardio, o ligamento periodontal desvitalizado tem sido removido empregando-se o hipoclorito de sódio, buscando o controle da reabsorção radicular. Relatos de efeito irritante no tecido conjuntivo alveolar após o seu uso, têm sido descritos. Isso justificou a realização do trabalho por Sottovia et al. (2006) que buscaram minimizar esse inconveniente. Para isso 24 ratos, divididos em 3 grupos de 8 animais, tiveram o incisivo superior direito extraído e mantido sobre bancada para ressecamento por 60 min. Posteriormente, os dentes do grupo I foram imersos em soro fisiológico por 2 min. No grupo II, os dentes tiveram a superfície radicular friccionada com gaze embebida em soro fisiológico por 2 min e no grupo III a fricção foi feita empregando-se solução de hipoclorito de sódio a 1%. Todos os dentes tiveram então a superfície radicular tratada com ácido fosfórico a 37% seguido de imersão em solução de fluoreto de sódio fosfato acidulado a 2%, pH 5,5. Os canais foram obturados com pasta de hidróxido de cálcio e os dentes foram reimplantados. Os

animais foram sacrificados 60 dias depois e as peças contendo os dentes foram processadas em laboratório. Cortes transversais semi-seriados do terço médio da raiz, foram obtidos e corados com hematoxilina/eosina para análise histomorfométrica. Os resultados demonstraram que a estrutura radicular e a extensão de cemento foram mais afetadas pela reabsorção no grupo III. Todos os grupos foram comprometidos pela reabsorção radicular sendo que o tratamento realizado no grupo III foi o menos efetivo para o seu controle. O tratamento realizado nos grupos I e II proporcionou resultados semelhantes entre si.

Ainda com o objetivo de estudar sobre a melhor forma de se remover o ligamento periodontal, Esper et al. (2007) testou duas técnicas mecânicas fazendo a preservação ou a remoção da camada de cemento. Quarenta e cinco raízes de pré-molares saudáveis extraídos por propósitos ortodônticos foram mantidos à temperatura ambiente durante 1 h e depois mergulhados em solução salina para reidratação por 10 min. As raízes foram distribuídas por três grupos, da seguinte forma: grupo 1 (Controle) - o ligamento periodontal foi preservado; Grupo 2 -remoção do ligamento periodontal por raspagem da superfície da raiz com uma lâmina de bisturi (SBS); Grupo 3 - ligamento periodontal foi removido usando uma escova de cerdas Robinson em baixa rotação em solução de pedra-pomes e água (RBP). Os espécimes foram analisados histomorfométricamente e por microscópio eletrônico de varredura. As análises quantitativas e qualitativas dos resultados mostraram que a técnica RBP foi significativamente mais eficaz do que a técnica SBS para remoção dos remanescentes do ligamento periodontal. Ambas as técnicas preservaram a camada de cemento.

Hu et al. (2010) analisaram quantitativamente os efeitos de diferentes concentrações e dos tempos de exposição do hipoclorito de sódio (NaOCl) na desproteínação dentinária. Os dentes foram tratados com 0,5%, 1% ou 2,25% de NaOCl durante 1, 5 ou 10 min. Uma solução de NaCl a 0,9% serviu de controle. Para investigar o efeito do NaOCl na superfície química da dentina de dentes humanos, a técnica de espectroscopia infravermelha (ATR-FTIR) foi utilizada para analisar a relação amida/ fosfato e carbonato/fosfato. Foi observado que a relação amida/fosfato diminuiu significativamente após o tratamento com NaOCl em comparação com o grupo controle. No grupo de tratamento com NaOCl 0,5% a proporção amida/fosfato foi significativamente maior que a do 1% e os tratamento com NaOCl 2,25%. Os

diferentes tempos de exposição (1, 5 ou 10 min) de NaOCl dentro da mesma concentração não influenciou a taxa de amida/fosfato. O tratamento com NaOCl não afetou a relação carbonato/fosfato. É recomendado o uso do NaOCl 0,5% como concentração para uso rotineiro na raiz para minimizar qualquer desproteinação dentinária.

Ainda em 2014, Bai et al. compararam a eficácia do hipoclorito de sódio (NaOCl) usado em diferentes concentrações e tempos para remover o ligamento periodontal necrótico (PDL) a partir de dentes reimplantados e observaram os efeitos do NaOCl na superfície e na microdureza do cimento. Foram selecionados 88 pré-molares saudáveis com uma única raiz e mantidos secos à temperatura ambiente durante 1 h. Os dentes foram divididos em 11 grupos: grupo 1 (controle): as raízes não foram tratadas; Grupo 2: PDL necrótico foi removido com gaze; Grupos 3-11: dentes foram imersos em NaOCl em diferentes concentrações (1, 2,5 e 5,25%) e para diferentes tempos de trabalho (5, 10 e 15 min). Os espécimes de cada grupo foram inspecionados separadamente para analisar a integridade do cimento e a presença de restos PDL por histomorfometria, microscopia confocal de varredura a laser e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Outros 14 pré-molares saudáveis com raízes divididas em duas partes foram selecionados para indentação pelo teste de microdureza Vickers antes e depois do tratamento com NaOCl. Os autores relataram que nos dentes tratados com NaOCl 1% durante 15 min ou NaOCl 5,25% durante 5 min, o cimento permaneceu morfologicamente intacto sem rachaduras, e estavam sem restos de PDL. No grupo NaOCl a 1% durante 15 minutos a microestrutura do cimento foi organizada regularmente. Os dentes de cada um dos outros grupos exibiram danos no cimento e / ou a presença de restos de PDL. O teste de microdureza revelou que o tratamento com NaOCl 1% durante 15 min ou NaOCl 5,25% durante 5 min diminuiu significativamente a microdureza da raiz. Por isso indicam o NaOCl 1% durante 15 min ou NaOCl 5,25% durante 5 min pois foi efetivo na remoção do PDL necrótico dos dentes para reimplante tendo uma influência mínima sobre a integridade do cimento. Mas ressaltam que o NaOCl 1% durante 15 min foi menos prejudicial para o cimento.

Em um estudo histológico Barbizam et al. (2015) procurou avaliar a cura periodontal de dentes de cães reimplantados após 20 min (tempo curto) e 60 min (tempo longo) observando o tempo extraoral com e sem a aplicação de proteínas da

matriz de esmalte. As raízes (40 dentes) de pré-molares foram extraídas, os canais radiculares foram acessados, instrumentados e preenchidos usando a técnica de condensação lateral e a cavidade de acesso foi restaurada com amálgama. Cada raiz foi atribuída aleatoriamente para um dos grupos experimentais: Grupos I e II: as raízes foram reimplantadas após um tempo extra-bucal de 20 min. Dentro do Grupo II, Emdogain foi aplicado diretamente na superfície da raiz externa com cobertura completa. Grupos III e IV: as raízes foram reimplantadas após um tempo extra-oral de 60 min. No grupo IV, Emdogain foi aplicado a toda a superfície da raiz externa antes do reimplante. As raízes que foram reimplantadas dentro de um tempo extraoral de 10 min foram usadas como controle negativo, enquanto aquelas que foram reimplantadas após 90 min foi o controle positivo. Após 4 meses, os cães foram sacrificados, e os processos maxilares e mandibulares foram processados para avaliação histológica e microscópica. Este estudo mostrou que 20 min de tempo seco extraoral é tão prejudicial para as células PDL como 60 ou 90 min, mesmo quando reimplantados com um material indutivo, como o Endogain. Este estudo forneceu evidências fortes em relação ao limite de tempo extraoral que os dentes que sofrem avulsão suportam sem afetar a viabilidade celular do PDL, sugerindo que o tempo é menor do que o estipulado pelos guias de tratamento.

Buscando determinar qual a concentração ótima de hipoclorito de sódio (NaClO) suficiente para dissolver matéria orgânica da dentina Tartari et al. (2016) avaliou também as alterações na composição química desta usando diferentes concentrações de NaOCl ao longo do tempo. Fragmentos do tecido muscular bovino foram pesados antes e após 5, 10 e 15 min de imersão em G1-solução salina 0,9%; G2-NaOCl 1%; G3-NaOCl 2,5%; e G4-NaOCl 5%. Coroas de dentes bovino foram fatiadas e os fragmentos de dentina foram submetidos à mesma irrigação e absorção foi medida em espectrofotômetro (ATR-FTIR) antes e após 0,5, 1, 2, 3, 5, 8 e 10 min de imersão. As proporções da absorção de amida III / fosfato e carbonato / fosfato também foram determinadas. Os autores verificaram que o aumento da concentração do NaClO e o tempo de contato intensificaram a dissolução da matéria orgânica e o colágeno da dentina com redução da amida III / fosfato. Houve diferenças significantes entre todos os grupos. Foi observada diferença na dissolução de matéria orgânica aos 10 min e na amida III / fosfato entre a solução salina e NaOCl 5% a 5 min. A relação carbonato/fosfato diminuiu nos grupos G2, G3 e G4 após 5 min de imersão, mas não

ocorreram alterações significantes nos períodos subsequentes. O estudo indica que o aumento do tempo de exposição e da concentração da solução de NaOCl leva a um aumento na dissolução do tecido e do colágeno da dentina. Além disso, alguns íons de carbonato são removidos da fase inorgânica da dentina pelo NaOCl.

2.2 Citocinas Inflamatórias

Imediatamente após um dente que sofreu um trauma de avulsão ser reimplantado, uma resposta inflamatória complexa ocorre como parte do processo de cura do periodonto, as macromoléculas da matriz extracelular são essenciais para criar um ambiente celular necessário durante a cicatrização e morfogênese. Influenciam a atividade, diferenciação, proliferação e sobrevivência da célula, assim como atenuam ou aumentam a resposta inflamatória (Oliveira et al., 2011).

Kim et al. (2012) em seu estudo, procurou analisar o tempo ideal para o reimplante tardio de dentes com periodontite. Avaliaram o processo de cicatrização do local do dente após a extração de dentes induzidos por periodontite em ratos. Vinte e oito dentes foram divididos aleatoriamente em dois grupos: um grupo de controle (n = 8) e um grupo teste (n = 20). No grupo teste, a periodontite foi induzida por uma ligadura em torno do colo do primeiro molar mandibular de todos os ratos. Duas semanas depois os dentes foram extraídos de todos os animais. Os animais foram sacrificados nos dias 0, 3, 7 e 10 após a extração e a análise histológica e imuno-histoquímica foi realizada. Na análise histológica do grupo teste, foi encontrado um infiltrado de células inflamatórias abundantemente no período de 3 dias após a extração dentária e diminuiu gradualmente ao longo dos tempos posteriores. Na análise imuno-histoquímica do grupo teste, a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α) foram numerosos na área de furca. A IL-6 foi corada mais intensamente entre 3 e 7 dias após a extração. Já no dia 10, pequena coloração foi observada. A coloração com TNF- α foi mais intensa nos 3 dias após a extração e gradualmente enfraquecida nos tempos posteriores. Portanto, os autores concluíram que leva pelo menos 10 dias para que a inflamação periodontal na extração de dentes de ratos seja sanada.

Belibasakis et al. (2013) tiveram por objetivo avaliar, in vitro, o efeito do complexo vermelho como constituinte do biofilme subgengival na regulação da IL-8 no epitélio gengival. Para a pesquisa, foram selecionados os microrganismos *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Veillonella díspar*, *Actinomyces oris*, *Streptococcus anginosus* e *Streptococcus oralis* e outras 7 espécies que não fazem parte do complexo vermelho (controle). Os biofilmes cresceram em placas de 24 poços sobre discos sintéticos de hidroxiapatita simulando superfície radicular. Para os testes de cultura celular e citotoxicidade foram utilizadas células epiteliais da gengiva estratificada que foram expostas aos biofilmes. Além disso, foi realizado o teste de qPCR para expressão gênica e ensaio de ELISA para avaliação da expressão de IL-8. Após 3 h, os biofilmes revelaram expressão da IL-8, porém, a presença do complexo vermelho resultou em uma maior expressão. Portanto, os autores concluíram que o complexo vermelho é capaz de regular a expressão de IL-8 no epitélio gengival, potencialmente afetando a resposta quimiotática dos tecidos.

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

Ainda avaliando a correlação entre diferentes tempos que os dentes permaneceram extra-alveolares e as citocinas inflamatórias e a expressão genética das metaloproteinases da matriz (MMPs) como parte da expressão dos genes do ligamento periodontal (PDL) Ahn et al. (2016) avaliaram as diferentes citocinas

presentes na matriz extracelular. As MMPs são endopeptidases dependentes do zinco e conhecidas por sua capacidade de se dividir em um ou vários constituintes da matriz extra-celular (ECM). A primeira fase do estudo teve como objetivo testar células PDL humanas *ex vivo*. Os dentes extraídos permaneceram em temperatura ambiente por 15 e 30 min. As células PDL foram extraídas e analisadas por qRT-PCR. A segunda fase foi realizada *in vivo* e 36 primeiros molares maxilares de ratos Dawley Sprage foram extraídos e reimplantados após 15, 30 e 60 min. Foram testados os níveis de inflamação das citocinas e MMPS do tecido periodontal em 3, 7 e 28 dias após o reimplante do dente. A área reimplantada foi dissecada e analisada por RT-PCR. Expressões de IL-1beta, IL-6, TNF-alfa e MMP-3 e MMP-9 foram significativamente maiores nos dentes reimplantados. O tempo de ressecamento prolongado teve uma correlação direta com a indução de citocinas pró-inflamatório e MMPs em células PDL. Este estudo mostrou que as citocinas pró-inflamatórias foram expressas de forma mais significativa nos tecidos que rodeiam os dentes reimplantados. Pesquisas futuras devem ser realizadas de forma adicional que confirme a liberação dessas citocinas e que foque a inibição dessas para assim reduzir a inflamação dos dentes reimplantados.

Recentemente, Bastos et al. (2017) investigaram o padrão de expressão de moléculas da inflamação em dentes humanos extraídos que apresentavam reabsorção radicular externa inflamatória (IERR) e reabsorção radicular externa por substituição (RERR) após reimplante. Fragmentos da raiz de 22 dentes com IERR e de 20 dentes com RERR foram triturados usando um homogeneizador para extrair moléculas inflamatórias. Interleucina-1beta (IL-1b), IL-1Ra- fator de crescimento transformante beta, IL-8 / CXCL8, CCL2, CCL3 e CCL5 foram medidas usando ensaio de imunoabsorção ligada a enzimas de ligando duplo. IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNFalfa, interferon gama e IL-17A foram avaliados usando o citômetro Bead Array kit Multiplex Th1 / Th2 / Th17. Concentrações de citocinas e quimiocinas foram comparadas nos grupos RERR e IERR corrigidos pela idade dos pacientes no momento da extração, pelo tempo de sobrevivência após o reimplante, e pelo índice de ERR, adotando um modelo de equação de estimativa generalizada. O grupo IERR apresentou níveis mais elevados de TNFalfa do que o grupo RERR, mesmo após a correção pelo índice de ERR ($P < 0,05$). Os níveis de IL-1Ra foram maiores no grupo IERR para os casos moderados, mas maior no grupo RERR para casos de doenças graves. A

concentração de IL-4 tornou-se maior com o aumento da idade dos pacientes no grupo RERR, mas não variou no grupo IERR. Os níveis de CCL2 diminuíram com o aumento da idade dos pacientes no momento da extração independentemente do tipo ou índice de ERR. Os resultados presentes mostraram diferenças no perfil imunológico de IERR e RERR que pode ser relevante para entender os mecanismos biológicos subjacentes.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo foram:

- avaliar a viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal em contato com discos radiculares submetidos ou não ao ressecamento de superfície por diferentes tempos e tratados com EDTA 17% e com ou sem ácido hialurônico;
- quantificar as citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α expressas por fibroblastos do ligamento periodontal em contato com os discos radiculares;
- observar a adesão destes fibroblastos na superfície dos discos radiculares tratados.

4 MATERIAL E MÉTODO

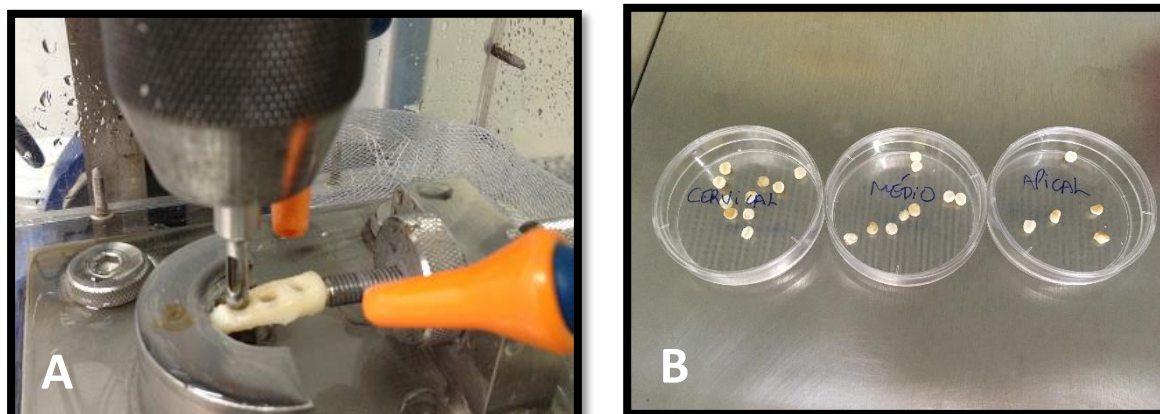
Esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP sob o número nº 02/2017-CEUA-ICT-SJC-UNESP (ANEXO A).

4.1 Preparo dos discos

Para o estudo foram utilizados 108 discos radiculares obtidos de dentes bovinos recém extraídos que foram mantidos congelados em água deionizada até o momento da utilização. Os dentes bovinos tiveram o ligamento periodontal da superfície radicular externa removido com solução de hipoclorito de sódio 1% por 15 min.

A seguir os dentes foram lavados e mantidos em água deionizada a uma temperatura de -18 °C até o momento da sua utilização. Para a obtenção dos espécimes utilizou-se uma broca diamantada do tipo trefina, adaptada à recortadora de amostras circulares. O corte foi obtido sob refrigeração na face vestibular da superfície radicular dos dentes. Foram obtidos dois a três discos por dente. Os discos obtidos apresentam 2 mm espessura por 4,5 mm de diâmetro e foram recortados dos terços cervical, médio e apical (Figura 1).

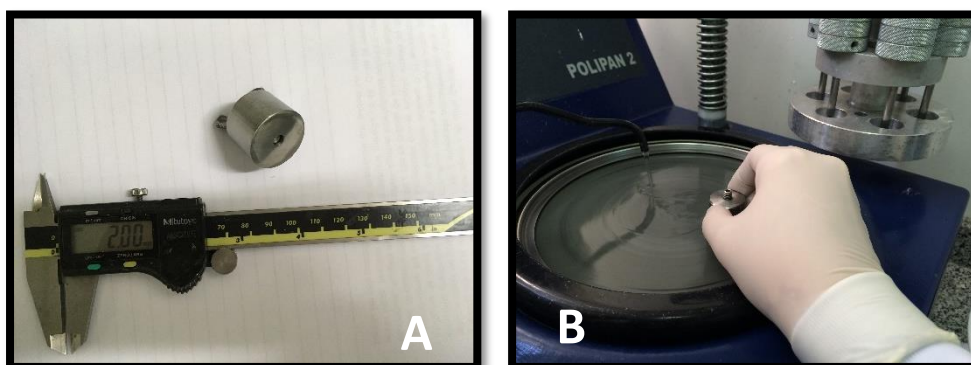
Figura 1 - Obtenção dos discos de dentina com cimento



Legenda: A) adaptação das raízes bovinas na recortadora de amostras circulares e obtenção dos discos de dentina e cimento; B) discos recortados e separados por terços cervical, médio e apical.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Os discos foram adaptados a dispositivos e regularizados em lixadeira politriz (DP 10 – Panambra), com a superfície dentinária voltada para a lixa. A superfície radicular externa contendo o cimento não foi tocado. Foram utilizadas lixas d'água de carbeto de silício de granulação crescente (1200 e 2400) com a finalidade de se obter uma superfície lisa, polida e uniforme, padronizando a altura das amostras em 2mm em Paquímetro digital (Absolut Digimatic, Mitutoyo Sul Americana; Santo Amaro, São Paulo, Brasil) (Figura 2).

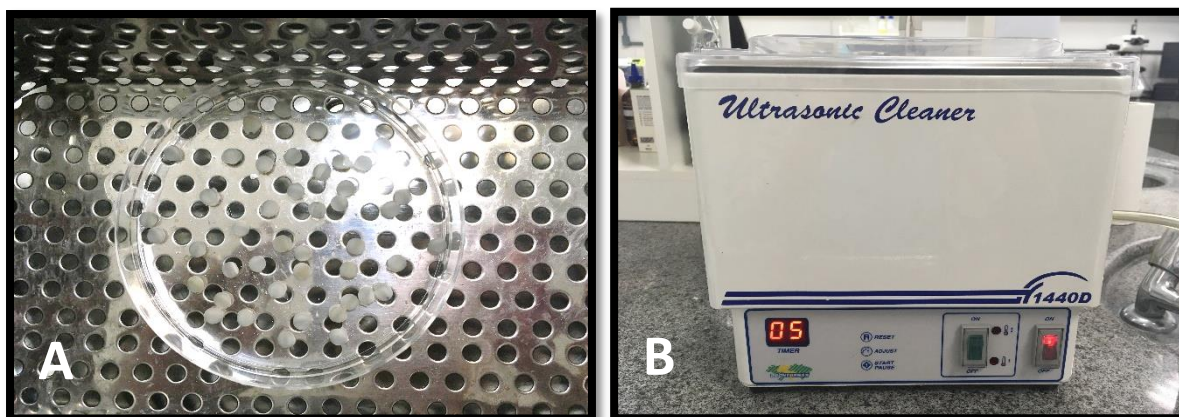
Figura 2 - Padronização da altura dos discos de dentina e cimento



Legenda: A) paquímetro digital para padronizar a altura de 2mm dos discos e adaptador de amostra circular de diâmetro 4,5mm; B) adaptador de amostra circular sobre a lixadeira da politriz.
Fonte: Elaborada pelo autor.

A seguir os discos foram limpos em cuba ultrasônica por 5 min (Ultrasonic Cleaner– 1440D da Odondobras, São Paulo, Brasil) (Figura 3).

Figura 3 – Limpeza dos discos em cuba ultrasônica

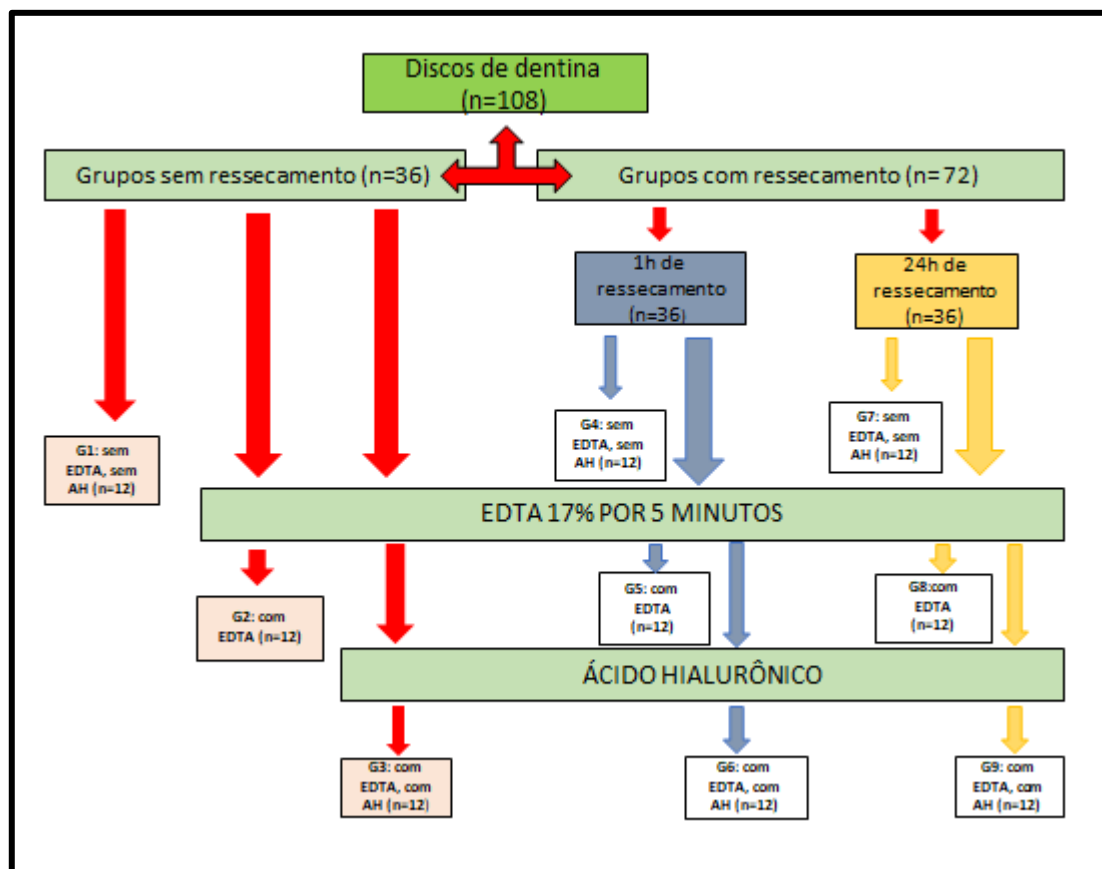


Legenda: A) discos de dentina e cimento sobre placa de petri em cuba ultrasônica; B) cuba ultrasônica.
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.1 Tratamento dos discos com EDTA e ácido hialurônico

Os discos foram divididos em 9 grupos de acordo com o tempo de ressecamento e o tratamento ou não com ácido hialurônico (HyStem, Sigma-Aldrich Brasil LTDA., São Paulo, Brasil) (Figura 4).

Figura 4 - Divisão dos grupos experimentais



Legenda: AH: ácido hialurônico.

Fonte: Elaborada pelo autor.

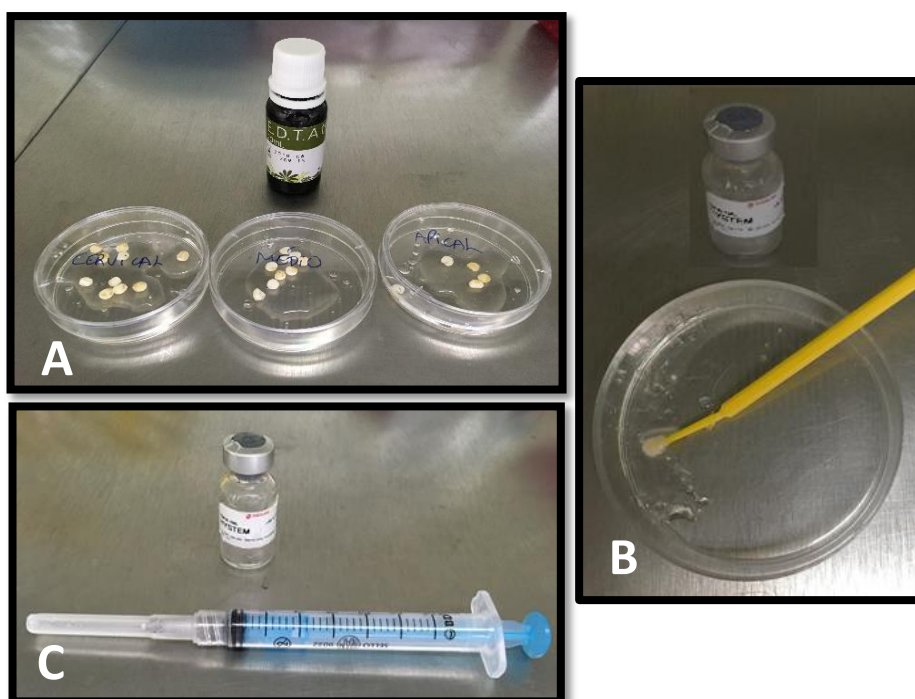
Os discos foram esterilizados em concentrações decrescentes de álcool (100%,90%,80% e 70%) durante 10 min cada e em seguida lavados com PBS estéril. Os discos foram deixados em PBS durante a noite a 4 °C (Nör et al, 2001). Os grupos que receberam ressecamento, foram deixados em temperatura ambiente sobre a superfície da bancada, pelos períodos de 1 h e 24h, respectivamente. Nos grupos sem ressecamento, imediatamente após a esterilização dos discos estes foram levados a câmara de fluxo laminar e colocados em contato com os tratamentos preconizados e posteriormente com os fibroblastos.

Os grupos que receberam aplicação de EDTA, os discos foram mergulhados

por 5 minutos em EDTA 17% (Biodinâmica Quim. e Farm. LTDA. Paraná, Brasil) em quantidade suficiente para cobrir a superfície dos mesmos. Após o EDTA foi aspirado e em seguida os discos lavados com 5 ml de PBS e aspirado em seguida (Figura 5A).

Já os grupos que receberam o ácido hialurônico, este após o preparo conforme a recomendação do fabricante, foi retirado do frasco com ajuda de uma seringa de 3ml e colocado em uma placa de petri, em seguida com um microbush foi aplicado 1 gota (10µL) e espalhada sobre a superfície dos discos. (Figura 5 B e C).

Figura 5 – Tratamento dos discos com EDTA 17% e ácido hialurônico



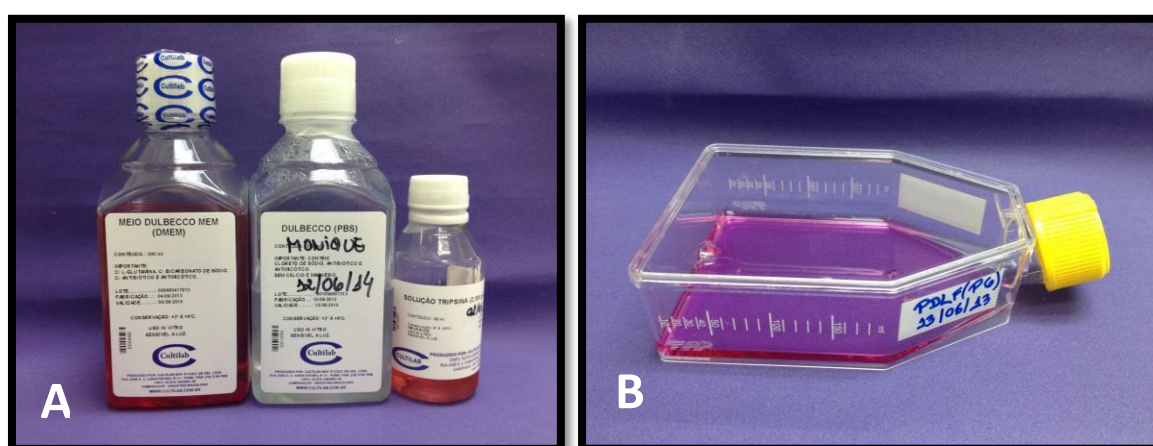
Legenda: A) Aplicação de edta 17% nos discos com cimento. B) Aplicação de ácido hialurônico nos discos com microbush. C) Seringa para retirada do ácido hialurônico do frasco pre- preparado.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Após os diferentes procedimentos e tratamentos, os discos foram colocados em placas de 96 poços onde ficaram em contato com as células para a realização dos testes de viabilidade celular por ensaio de XTT e microscopia eletrônica de varredura.

4.2 Cultivo das células

Para o experimento foram utilizadas células de fibroblastos provenientes de cultura primária do ligamento periodontal humano (PDLF) adquiridas sob o Código: CC-7049 – HPdLF-Peridon Lig Fibro SCGM, cryo amp (1 unidade), lote: 0000442484; Lonza do Brasil Especialidades Quim Ltda, Salto, SP – Brasil). As células foram semeadas em meio de cultura previamente preparado e, constituído por meio mínimo essencial de Dulbecco (DMEM) (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil), suplementado com soro fetal bovino a 10% (SFB) além de, solução de penicilina (10.000 UI/mL) e estreptomicina (10 mg/mL) (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil) (Figura 6 A). A cultura celular foi realizada em frascos próprios para cultivo (Techno Plastic Products AG., Zollstr, Suíça). Em seguida, estes foram levados para estufa a 37 °C com tensão de CO₂ 5% em umidade relativa 100% (Thermo Fisher Scientific Inc, EUA) (Figura 6 B).

Figura 6 – Material para cultura de células



Legenda: A) meio de cultura (DMEM), PBS e Tripsina; B) frasco utilizado para cultivo de células.
Fonte: Elaborada pelo autor.

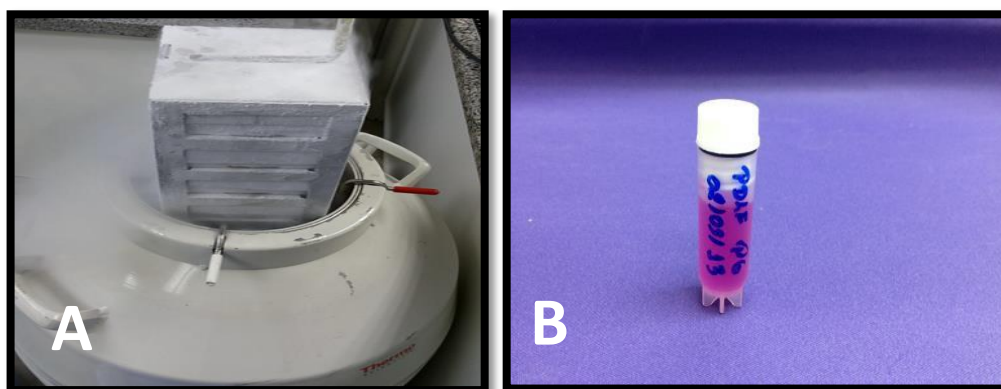
4.2.1 Descongelamento

Todos os procedimentos foram realizados dentro da capela de fluxo laminar (Grupo Veco, Campinas, Brasil). Em um frasco grande para cultura de célula (garrafa 75 cm³ – 270 mL), foram pipetados 10 mL de meio de cultura preparado; esse procedimento foi realizado com antecedência, para que a tensão superficial do frasco e do meio fosse quebrada.

No livro de registros do banco de células foram selecionados o puxador e a caixa do tambor de nitrogênio (Thermo Fisher Scientific Inc, E U A) que contém as células desejadas (Figura 7 A).

Um tubo criogênico (Andradeslab, São Paulo, Brasil) foi removido e levado imediatamente para o banho-maria (Petrodidática Indústrias e Comércio Ltda, São Paulo, Brasil) até o descongelamento do mesmo. O tubo foi levado rapidamente para capela de fluxo laminar e o seu conteúdo despejado no frasco de cultivo contendo meio de cultura (Figura 7 B).

Figura 7- Descongelamento das células PDLF



Legenda: A) remoção do puxador e da caixa do tambor de nitrogênio; B) tubo criogênico contendo células PDLF.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O frasco foi levado ao microscópio de luz invertida (Leica DFC295 Microsystems Ltd, Heerbrugg, Suíça) para verificação da presença de células e em seguida à estufa a 37 °C com tensão de CO₂ 5% e umidade relativa 100% (Thermo Fisher Scientific Inc, EUA).

4.2.2 Troca de meio

A cada 48 h o meio de cultura celular foi trocado. O frasco de cultivo contendo as células foi removido da estufa, e as células foram verificadas no microscópio. O meio de cultura foi aspirado com pipeta e em seguida as células foram lavadas com 5 mL de PBS (solução salina de tampão de fosfato) (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil) para remoção de células mortas. Foram adicionados 10mL de um novo meio de cultura ao frasco, e este levado novamente à estufa.

4.2.3 Subcultura

Quando as células crescerem a ponto de ocupar quase todo o frasco (80% de confluência) após um período médio de cultivo entre 36 a 48 h, foi necessário realizar a subcultura, passando as células de um frasco de cultivo para dois ou mais, de acordo com o crescimento celular (Figura 8 A).

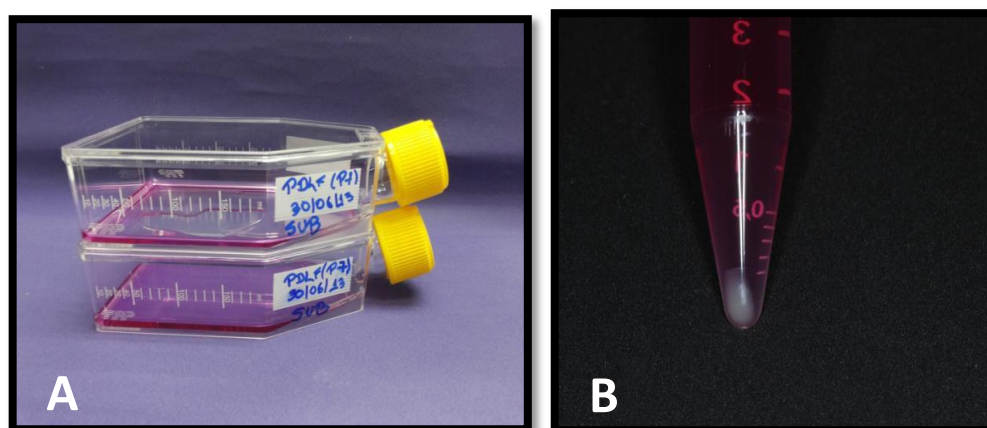
As células foram removidas da estufa e levadas à capela de fluxo laminar, o meio de cultura presente no frasco de cultivo foi aspirado. Em seguida, as células foram lavadas com 5 mL de PBS e este foi aspirado, por conseguinte. Foram adicionados ao frasco 3 mL de solução de tripsina 0,25% (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil), utilizada para destacar as células. Este frasco foi levado à estufa por 5 min e, em seguida, leves batidas na parte inferior do frasco foram realizadas, para auxiliar na remoção das células. Logo após foram adicionados 6 mL de meio fresco sobre as

células, neutralizando a tripsina.

Todo o conteúdo do frasco foi transferido para um tubo Falcon de 15ml, e este levado à centrífuga Centrifuge 5430 (Eppendorf AG 22331, Hamburg, EUA) por 5 min a 500 rcf, e, ao ser retirado, ocorreu a formação de um precipitado de células, denominado *pelet* (Figura 8 B). O sobrenadante foi novamente aspirado e as células ressuspensas em 1 mL de meio fresco.

Após bem homogeneizada, a suspensão foi dividida em dois ou mais frascos de cultivo de mesmo tamanho, contendo 10 mL de meio de cultura cada. Os frascos foram levados novamente à estufa, onde permaneceram até a troca de meio e/ou realização de uma nova subcultura. Esse procedimento foi realizado até se obter a quantidade necessária de células para a realização do teste

Figura 8 – Subcultivo das células PDLF



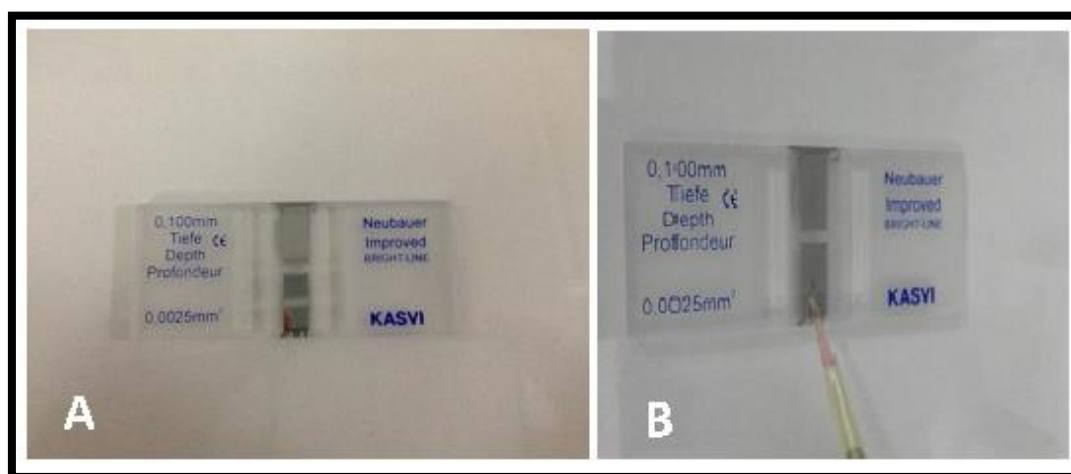
Legenda: A) remoção das células de um frasco de cultivo para dois frascos durante o subcultivo; B) precipitado celular (*pelet*).

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.4 Contagem de células

A contagem de células foi realizada antes do plaqueamento para que a mesma quantidade de células fosse colocada em cada poço das placas. Foram realizados os mesmos passos da subcultura até a obtenção do *pelet*, sendo que nesse caso, as células foram ressuspensas em 10 mL de meio fresco. Dessa suspensão, foram retirados 10 μ L, quantidade necessária levada à câmara de Neubauer (Labor Optik GmbH, Alemanha) onde foi realizada a contagem do número de células ao microscópio (Figura 9).

Figura 9 – Preparo para realização da contagem celular



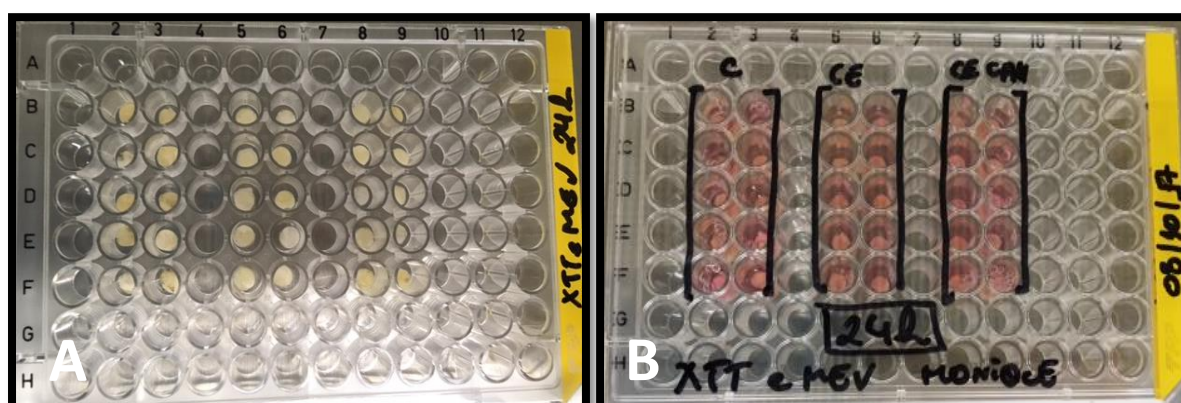
Legenda: A) câmara de Neubauer para contagem celular; B) 10 μ L de meio sendo colocado no interior do compartimento da câmara de Neubauer.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Para obtenção da quantidade de células por mL, foi utilizada a seguinte fórmula: $C \times 10^4 = \text{n}^\circ \text{ células/mL}$, Onde **C** corresponde à média das células viáveis encontradas nos quadriláteros periféricos presentes na câmara de Neubauer. Foram plaqueadas 10 mil células em 200 μ L de meio em cada poço.

4.2.5 Plaqueamento

Após a verificação da quantidade de células necessárias para o estudo, foi realizado o plaqueamento em placas de 96 poços. Cada disco foi colocado em um poço da placa com a face dentinária voltada para baixo, foram colocados 5 discos do terço cervical, 4 do terço médio e 3 do apical, totalizando os 12 discos por grupo, sendo dois discos para realização do MEV (Figura 10 A) Após 200 μ L de meio com células foi adicionado ao poço de forma que todo o disco tenha contato com o meio (Figura 10 B). A quantidade de células a ser utilizada foi de 10 mil células por 200 μ L de meio utilizado. As placas foram levadas à estufa a 37 °C, tensão de 5% de CO₂ com 100% de umidade, onde permaneceram por 48h.

Figura 10 – Placa de 96 poços com os discos de dentina e cimento



Legenda: A) discos de dentina e cimento distribuídos nos poços; B) plaqueamento de 200 μ L de meio contendo 10 mil células PDLF.

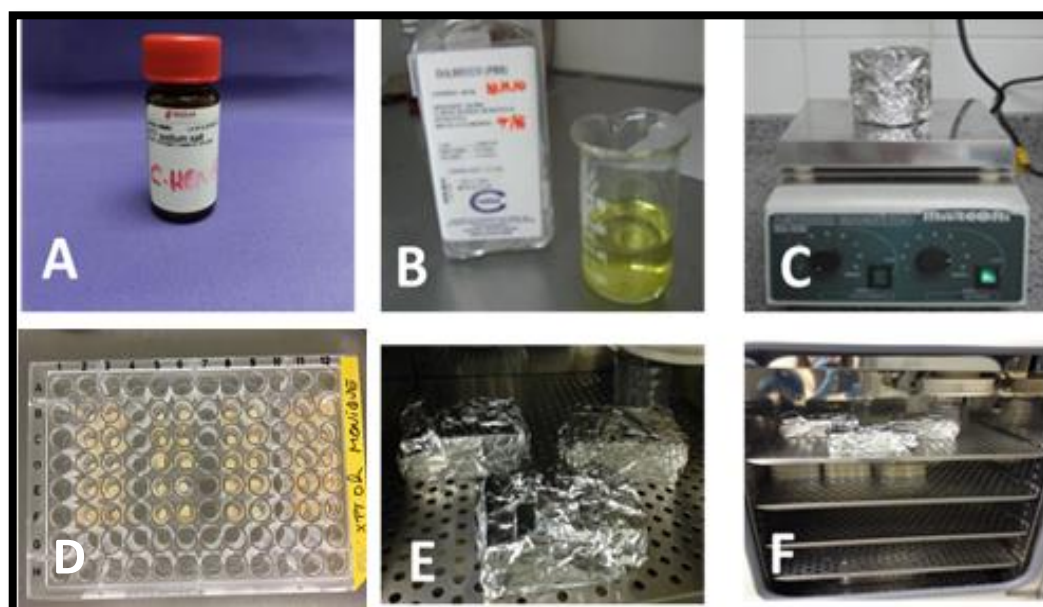
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3. Viabilidade celular - Ensaio XTT

O teste XTT baseia-se na habilidade de enzimas mitocondriais da atividade metabólica de células ativas em reduzir moléculas de 2,3-bis (2-methoxy- 4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) em sal solúvel formazan, de cor alaranjada detectável por uma absorbância de 490 nm (Scelza et al., 2012). Dez discos de cada grupo foram submetidos ao teste do XTT.

O teste XTT inicia-se com o preparo dos reagentes. A solução de XTT foi preparada diluindo-se 10 mg do pó de XTT, pesado em balança de precisão, em 10 mL de PBS. Após foram acrescentados ao XTT preparado, PBS e Menadiona. Para cada 40 μ L do XTT preparado foram colocados 158 μ L de PBS e 2 μ L de menadiona (pó + acetona) (Figura 11).

Figura 11 – Ensaio de XTT



Legenda: A) frasco contendo pó do XTT; B) becker contendo XTT diluído em PBS; C) solução de XTT protegida da luz com papel alumínio; D) XTT em contato com as células nas placas de 96 poços; E) placas envoltas em papel alumínio para proteger da luz; F) placas protegidas com papel alumínio levadas a estufa por 3 h.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os discos foram removidos da placa de 96 poços, lavados em PBS e transferidos para outra placa de 96 poços, com 200 μ L da solução de XTT em cada poço. As placas foram levadas à estufa por 3 h a 37° C envolvidas em papel alumínio devido à sensibilidade da solução à luz.

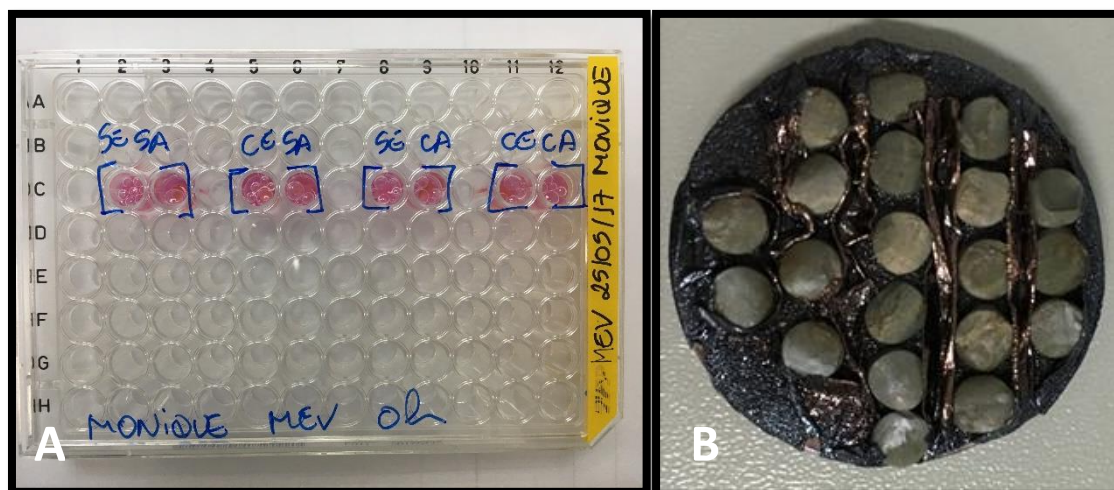
Após este período os discos foram retirados dos poços e as placas foram levadas ao espectrofotômetro (Asys 41 Hitech GmbH, Áustria) para leitura dos resultados em comprimento de onda de 490 nm. Os outros 2 discos foram preparados para microscopia eletrônica de varredura em M.E.V de baixo vácuo (Scanning Microscope – JSM – 840A jeol, Tóquio, Japão).

4.4 Verificação da adesão celular por MEV

A verificação da adesão celular de fibroblastos à superfície dos discos foi realizada por microscópio eletrônico de varredura (MEV), de caráter ilustrativo. Para isto, as células foram colocadas sobre os discos de dentina com cimento já tratados, e incubadas em meio de Eagle modificado por DMEM por 48h (Figura 12 A). As células foram fixadas em PBS contendo 4% (v/v) de paraformaldeído por 1 h e depois, desidratadas em sequência de etanol (10%, 25%, 50%, 75%, 90%) por 20 min em cada em etanol 100% por 1 h e deixadas em estufa 37 °C por 24 h para completa secagem.

A seguir dois discos de cada grupo foram metalizados e analisados em MEV. Para isso, as amostras foram colocadas em uma Metalizadora Emitech SC7620 Sputter Coater, recebendo camada de liga de Au-Pd em vácuo de 8 nm. Após, as amostras foram colocadas em stubs, fixados com fita carbono e posicionadas na câmara do Microscópio Eletrônico de Varredura Inspect S50 (FEI) e submetidas a vácuo. Foi utilizado o detector de elétron secundário LFD (Large Field Detector), bem como voltagem de 12.5 HV e Spot 5 (Figura 12 B).

Figura 12 – Discos para realização de análise por MEV

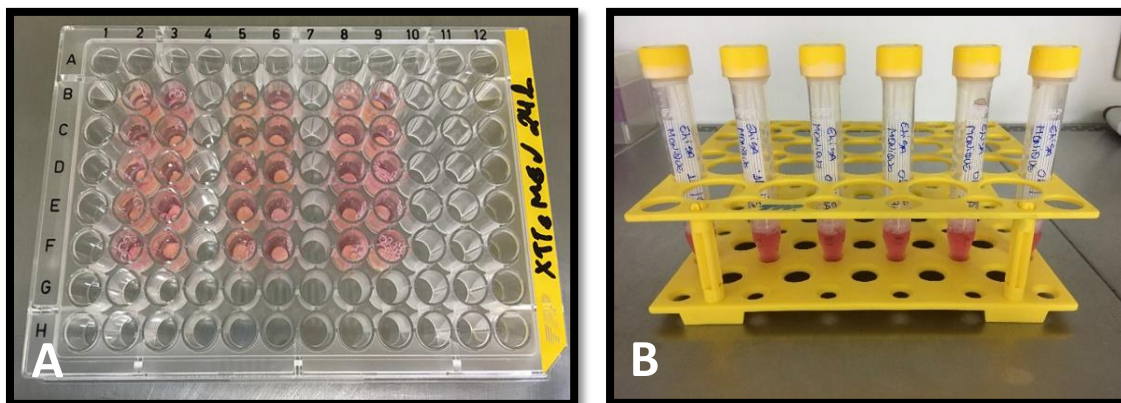


Legenda: A) discos de dentina e cimento distribuidos nos poços com o meio e células; B) discos colocados em *stub* e metalizados para análise de MEV.
Fonte: Elaborada pelo autor.

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

Para a quantificação de citocinas, foi utilizado o sobrenadante dos 10 discos de cada grupo tratados e mais o grupo controle (disco sem tratamento e somente no meio de cultura com células). Os discos foram colocados em placas de 96 poços contendo 200 μ L de meio de cultivo e 10 mil células por poço e foi aguardado um período de 48 h para o crescimento das mesmas. Os discos foram removidos e o sobrenadante foi congelado para ser utilizado para o teste (Figura 13).

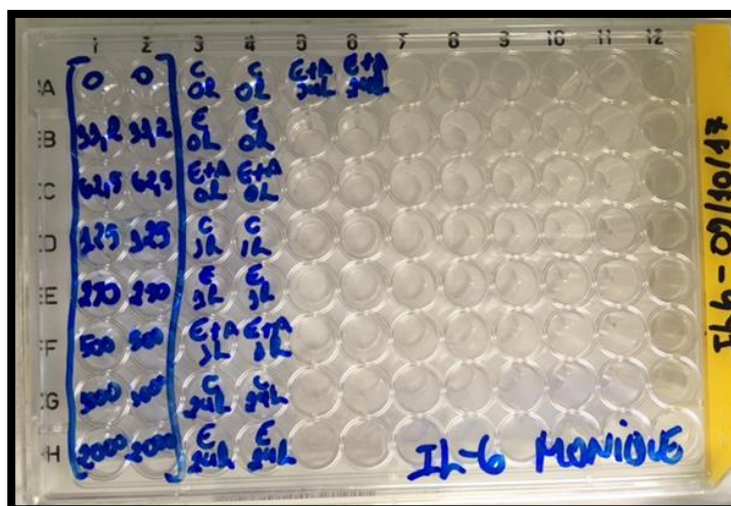
Figura 13 - Obtenção do sobrenadante dos discos para o teste de ELISA



Legenda: A) meio com as células que não aderiram na superfície dos discos; B) sobrenadante armazenado em tubos falcon de 15ml para congelamento.
Fonte: Elaborada pelo autor.

O ensaio de ELISA foi realizado em dois dias com o uso de kits laboratoriais específicos (Human Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, EUA). No primeiro dia, 4 placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 μ L de PBS e anticorpo de captura para cada citocina estudada (IL-6, IL-8, IL 1 β e TNF- α) e para o levantamento da curva padrão. As placas foram cobertas com filme plástico e deixadas sobre a bancada até o dia seguinte (Figura 14). No segundo dia de teste, os poços foram lavados 3 vezes com 300 μ L de solução tampão (tampão de lavagem) sendo esta composta por 980 mL de água destilada e 20 mL de Wash Buffer.

Figura 14 – Placa de 96 poços para o teste de ELISA



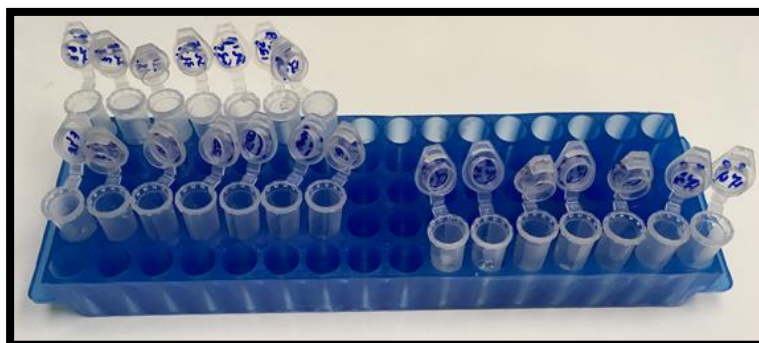
Legenda: placa de 96 poços sensibilizada com 100 μ L de PBS e anticorpo de captura para cada citocina estudada (IL-6, IL-8, IL 1 β e TNF- α).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A seguir, as placas foram batidas em guardanapo para completa secagem dos poços. O próximo passo foi a colocação de 300 μ L de solução de bloqueio (ou reagente diluente) na proporção de 100 mL de PBS para 1 g de BSA. As placas ficaram em repouso por 1 h.

Enquanto isso, as curvas padrão de cada citocina foram preparadas (5 grupos com 5 amostras cada). Foram colocados 600 μ L do reagente diluente nos primeiros eppendorfs de cada padrão e 300 μ L nos demais (7 eppendorfs em cada caso). O anticorpo de captura foi colocado no 1º eppendorf de cada grupo, sendo que sua quantidade foi calculada de acordo com o manual do fabricante. A diluição foi realizada passando-se 300 μ L do 1º eppendorf para o 2º e assim por diante (Figura 15).

Figura 15 – Preparo da Curva padrão para o teste de ELISA



Legenda: eppendorfs contendo as diluições do anticorpo de captura, específico para cada citocina, para confecção da curva padrão.

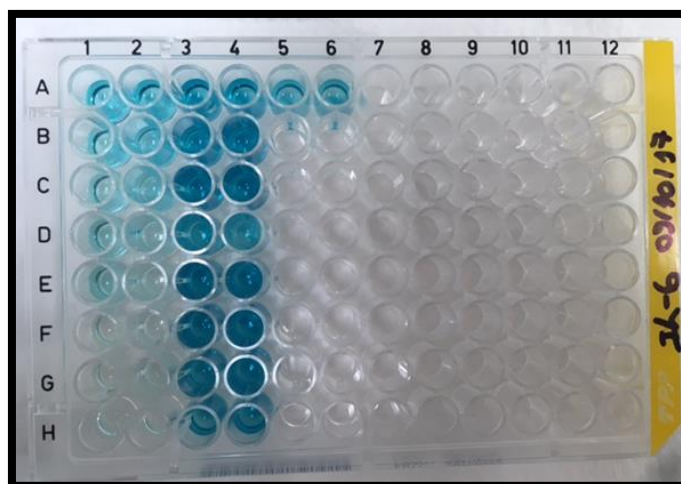
Fonte: Elaborada pelo autor.

Após essa 1 h de repouso, as placas foram novamente lavadas 3 vezes com 300 μ L de solução de lavagem e secas em guardanapo. Para a montagem das placas, foram colocados 100 μ L do padrão nas duas primeiras colunas (duplicata) e 100 μ L das amostras nos demais poços (também em duplicata). As amostras foram coletadas do sobrenadante dos poços plaqueados com células e discos tratados. Foi aguardado um período de 2h com as placas tampadas sobre a bancada.

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

A próxima etapa consistiu na lavagem das placas 3 vezes com 300 μ L de solução de lavagem, secagem das placas e aplicação de 100 μ L de streptavidina em cada poço (na proporção de 85 μ L de estreptavidina para 17 mL de PBS). As placas foram cobertas com papel alumínio e esperado 20 min. A seguir, as placas foram lavadas por 3 vezes com 300 μ L de solução de lavagem, secas e foi acrescido 100 μ L da solução A+B (em quantidades iguais) por poço (Figura 16).

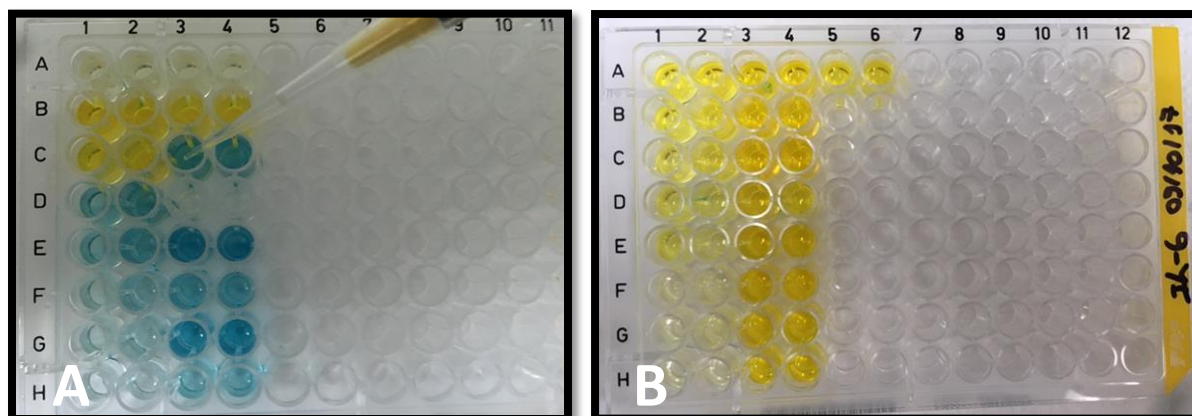
Figura 16 – Placa de 96 poços com a solução A+B para o teste de ELISA



Legenda: poços contendo 100 μ L da solução A+B.
Fonte: Elaborada pelo autor.

As placas foram novamente envoltas por papel alumínio e esperou-se 20 min para a reação. O material dos poços não foi removido e foram adicionados 50 μ L de solução stop (ácido sulfúrico 2N) em cada poço para parar a reação. O desenvolvimento e a intensidade da cor foram quantificados levando-se as placas para um espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm (Figura 17 A e B).

Figura 17 – Placa de 96 poços com a solução de stop para o teste de ELISA



Legenda: A) pipeta contendo 50 μ L de solução stop (ácido sulfúrico 2N) para cada poço; B) placa de 96 poços com a reação completa para leitura em espectrofotômetro.
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.6 Análise estatística

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

As variáveis experimentais para a avaliação da viabilidade celular do estudo foram a aplicação ou não de EDTA 17% por 5 min e ácido hialurônico na superfície de discos de dentina com cimento no tempo de ressecamento de 1h, 24h e sem ressecamento.

5 RESULTADOS

5.1 Viabilidade celular pelo teste de XTT

5.1.1 Análise descritiva

Na Tabela 1 apresentam-se os valores, em porcentagem, de média e desvio-padrão da viabilidade celular obtidos nos grupos estudados. A maior média (148,39) foi observada no grupo sem ressecamento para o tratamento EDTA+ácido hialurônico. As menores médias foram observadas no grupo controle, independente do tempo avaliado. Verifica-se que houve um aumento dos valores médios para o grupo EDTA conforme o tempo de ressecamento.

Tabela 1 – Valores de média±desvio-padrão da viabilidade celular (%) em cada grupo

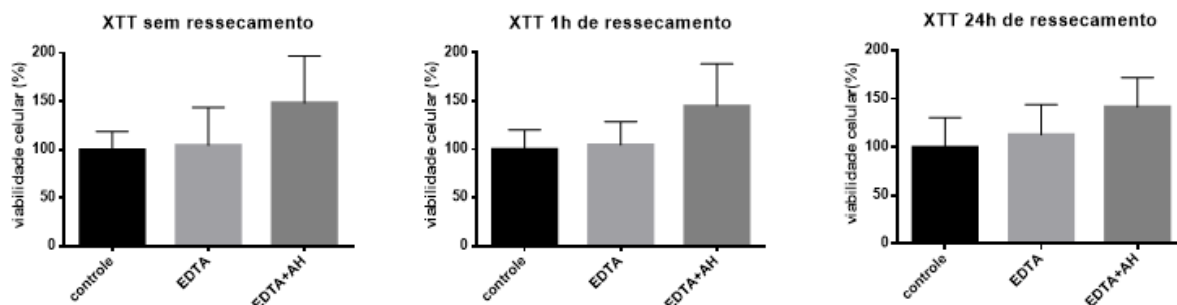
Tratamento	Ressecamento da superfície		
	Sem	1h	24h
Controle	100 ± 18,78	100,03 ± 20,20	100,02 ± 30,68
EDTA	104,59 ± 39,19	104,78 ± 23,97	112,83 ± 31,34
EDTA+AH	148,39 ± 48,38	144,91 ± 43,61	141,57 ± 28,30

Legenda: controle: sem aplicação de EDTA 17% e sem ácido hialurônico, EDTA: com aplicação de EDTA 17% e sem aplicação de ácido hialurônico e EDTA+AH: com aplicação de EDTA 17% e com aplicação de ácido hialurônico.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A figura 18 apresenta graficamente a análise descritiva das médias e desvio-padrão dos valores de viabilidade celular (%) evidenciando as diferenças obtidas entre os grupos experimentais.

Figura 18 - Gráfico de colunas (média $\pm$ dp) dos valores de viabilidade celular segundo os tratamentos da superfície dos discos de dentina/cimento sem ressecamento e com ressecamento de 1h e 24h



Legenda: controle: sem aplicação de EDTA 17% por 5 min e de ácido hialurônico; EDTA: aplicação de EDTA 17% por 5 min; EDTA + AH: aplicação de EDTA 17% por 5 min seguido de ácido hialurônico.
 Fonte: GraphPad Prism Inc.6.01(San Diego, CA, EUA).

5.1.2 Análise Inferencial

5.1.2.1 Grupo sem ressecamento da superfície radicular

Na tabela 2 apresentam-se os efeitos dos tratamentos da superfície radicular sem ressecamento. Segundo o teste ANOVA 1-fator, o fator tratamento apresentou efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na viabilidade celular.

Tabela 2 – Resultados do teste ANOVA (Análise de Variância) 1 fator, para o fator viabilidade celular sem ressecamento

Fatores	SQ	GL	MQ	F	P
Tratamento	11278	2	5639	3,845	0,0378*
Resíduos	30794	21	1466		
Total	42072	23			

Legenda: SQ: soma dos quadrados; GL: grau de liberdade; MQ: quadrado médio; F: razão; p: p-valor; * diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Fonte: GraphPad Prism Inc.6.01(San Diego, CA, EUA).

Na tabela 3 são apresentados os valores de média (%) e desvio-padrão referentes à viabilidade celular e os resultados do teste Tukey para o fator tratamento. Verificou-se que os grupos controle e EDTA diferiram significativamente do grupo EDTA+AH quantos aos tratamentos avaliados sem ressecamento do cimento.

Tabela 3 – Valores de média e desvio padrão da viabilidade celular (%) e resultados do teste Tukey para o fator tratamento

Tratamentos	Média $\pm$ DP	Grupos Homogêneos*
Controle	100 $\pm$ 18,78	A
EDTA	104,59 $\pm$ 39,19	A
EDTA+AH	148,39 $\pm$ 48,38	B

Legenda: *as médias acompanhadas da mesma letra não apresentam diferenças estatisticamente significantes.

Fonte: GraphPad Prism Inc.6.01(San Diego, CA, EUA).

5.1.2.2 Grupo com 1 h de ressecamento da superfície radicular

Na tabela 4, apresentam-se os efeitos dos tratamentos da superfície radicular com 1 h de ressecamento. Segundo o teste ANOVA 1-fator, observou-se que houve diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) para o fator tratamento.

Tabela 4 – Resultados do teste ANOVA 1 fator, para o fator tratamento com 1 h de ressecamento

Fatores	SQ	GL	MQ	F	P
Tratamento	8889	2	4445	4,859	0,0191*
Resíduos	18295	20	914,7		
Total	27184	22			

Legenda: SQ: soma dos quadrados; GL: grau de liberdade; MQ: quadrado médio; F: razão; p: p-valor; * diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Fonte: GraphPad Prism Inc.6.01(San Diego, CA, EUA).

Na tabela 5 são apresentados os valores de média (%) e desvio padrão referentes à viabilidade celular e os resultados do teste Tukey para o fator tratamento. Observa-se que a maior media foi apresentada pelo grupo EDTA+ AH, que diferiu significativamente dos grupos controle e EDTA.

Tabela 5 – Valores de média (%) e desvio-padrão da viabilidade celular e resultados do teste Tukey para o fator tratamento

Tratamentos	Média± DP	Grupos Homogêneos*
Controle	100,03 ± 20,20	A
EDTA	104,78 ± 23,97	A
EDTA+AH	144,91 ± 43,61	B

Legenda: *as médias acompanhadas da mesma letra não apresentam diferenças estatisticamente significantes.

Fonte: GraphPad Prism Inc.6.01(San Diego, CA, EUA).

5.1.2.3 Grupo com 24 h de ressecamento da superfície radicular

Na tabela 6 apresentam-se os efeitos dos tratamentos da superfície radicular com 24h de ressecamento. Segundo o teste ANOVA 1-fator, o fator tratamento apresentou efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na viabilidade celular.

Tabela 6 – Resultados do teste ANOVA 1 fator, para o fator tratamento com 24 h de ressecamento

Fatores	SQ	GL	MQ	F	P
Tratamento	6687	2	3344	3,5	0,0488*
Resíduos	20061	21	955,3		
Total	26749	23			

Legenda: SQ: soma dos quadrados; GL: grau de liberdade; MQ: quadrado médio; F: razão; p: p-valor; * diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Fonte: GraphPad Prism Inc.6.01(San Diego, CA, EUA).

Na tabela 7 são apresentados os valores de média (%) e desvio-padrão referentes à viabilidade celular e os resultados do teste Tukey para o fator tratamento. Observa-se que a maior média foi apresentada pelo grupo EDTA+AH, que diferiu significativamente do grupo controle. O grupo EDTA apresentou comportamento intermediário, sem diferenças significantes entre os demais grupos.

Tabela 7 – Valores de média (%) e desvio-padrão da viabilidade celular e resultados do teste Tukey para o fator tratamento

Tratamentos	Média $\pm$ DP	Grupos Homogêneos*
Controle	100,02 $\pm$ 30,68	A
EDTA	112,83 $\pm$ 31,34	A B
EDTA+AH	141,57 $\pm$ 28,30	B

Legenda: *as médias acompanhadas da mesma letra não apresentam diferenças estatisticamente significantes.

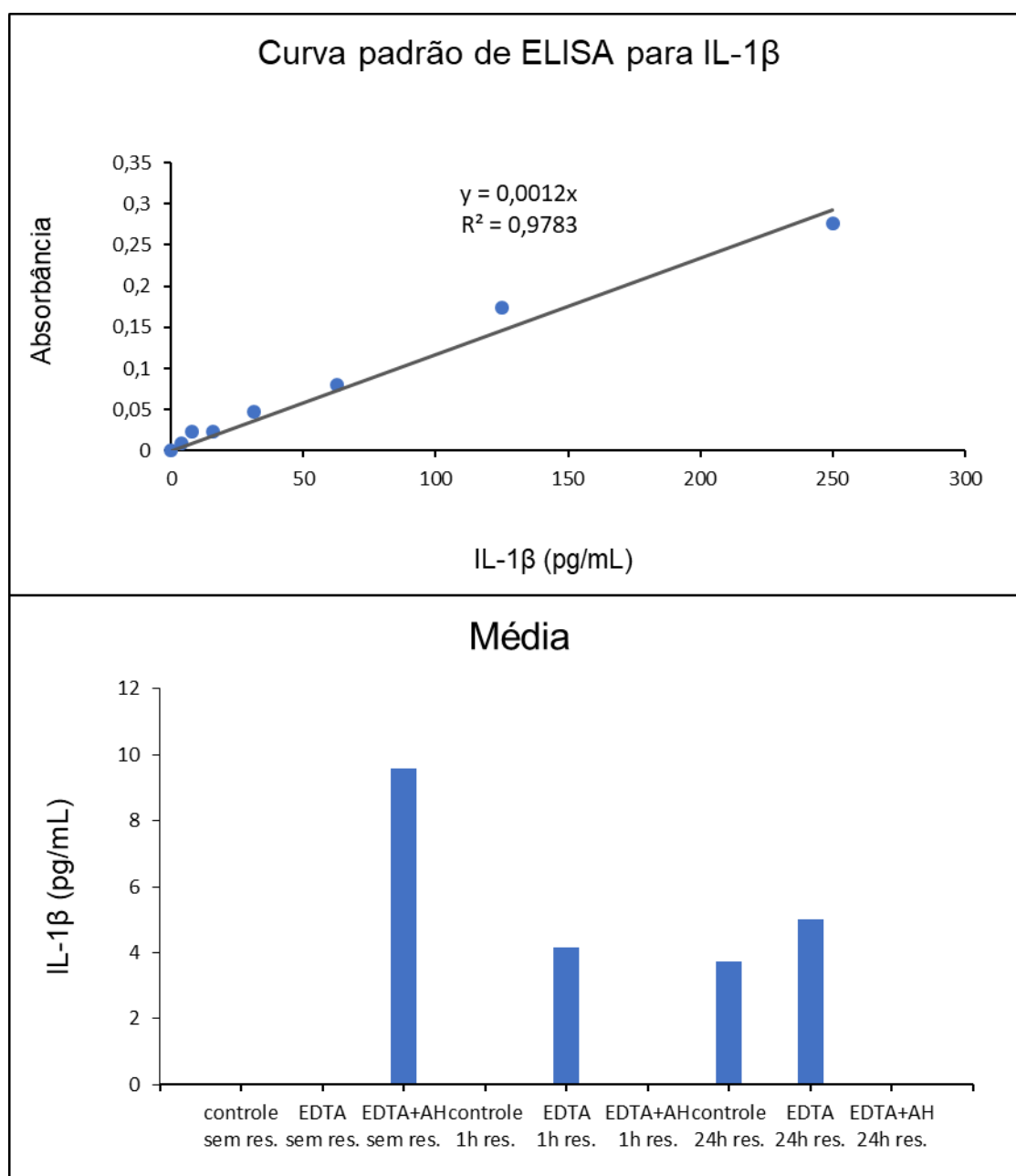
Fonte: GraphPad Prism Inc.6.01(San Diego, CA, EUA).

5.2 Quantificação de citocinas pelo teste de ELISA

O teste de ELISA foi realizado para avaliar a expressão das citocinas IL 1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α pelos fibroblastos do ligamento periodontal frente as superfícies radiculares tratadas com as substâncias testadas. Podemos observar nas figuras 19, 20, 21 e 22 as curvas padrão e as médias para cada citocina e sua expressão.

Verifica-se na figura 19 o padrão de expressão da interleucina 1 β . Observa-se que houve a expressão desta interleucina nos tratamentos: EDTA+AH (sem ressecamento), EDTA (1 h de ressecamento), controle (24 h de ressecamento) e EDTA para 24h de ressecamento.

Figura 19 – Gráficos de curva padrão e média para a IL-1 β em células de PDLF

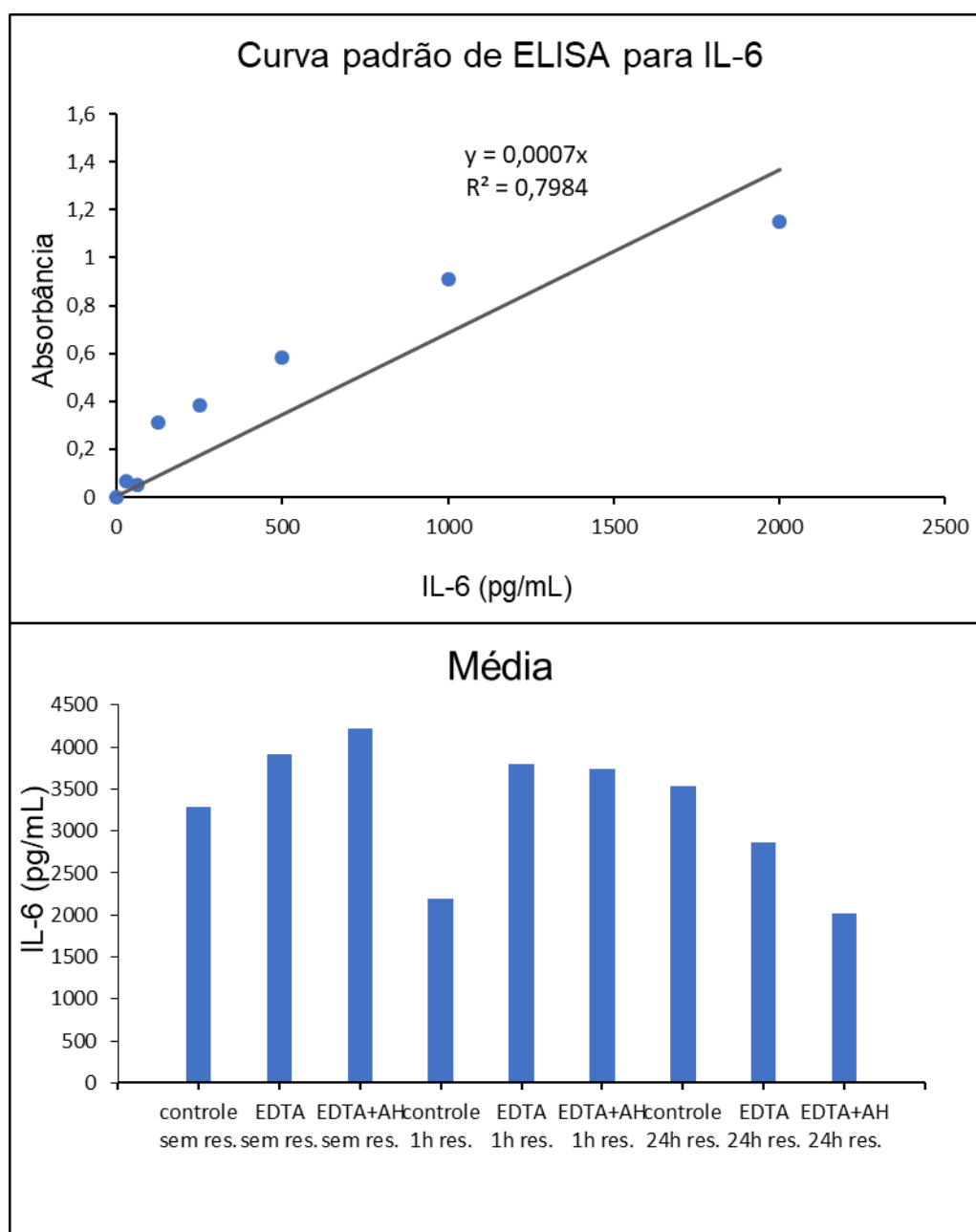


Fonte: Microsoft Excel.

A figura 20 apresenta o padrão de expressão da interleucina 6. Verifica-se que para os grupos sem ressecamento e 1 h de ressecamento, os tratamentos EDTA e EDTA+AH não conseguiram reduzir a expressão desta citocina em relação aos seus

respectivos controles. Contudo, no grupo 24h de ressecamento, os tratamentos EDTA e EDTA+A conseguiram reduzir a expressão da IL-6 em relação ao controle.

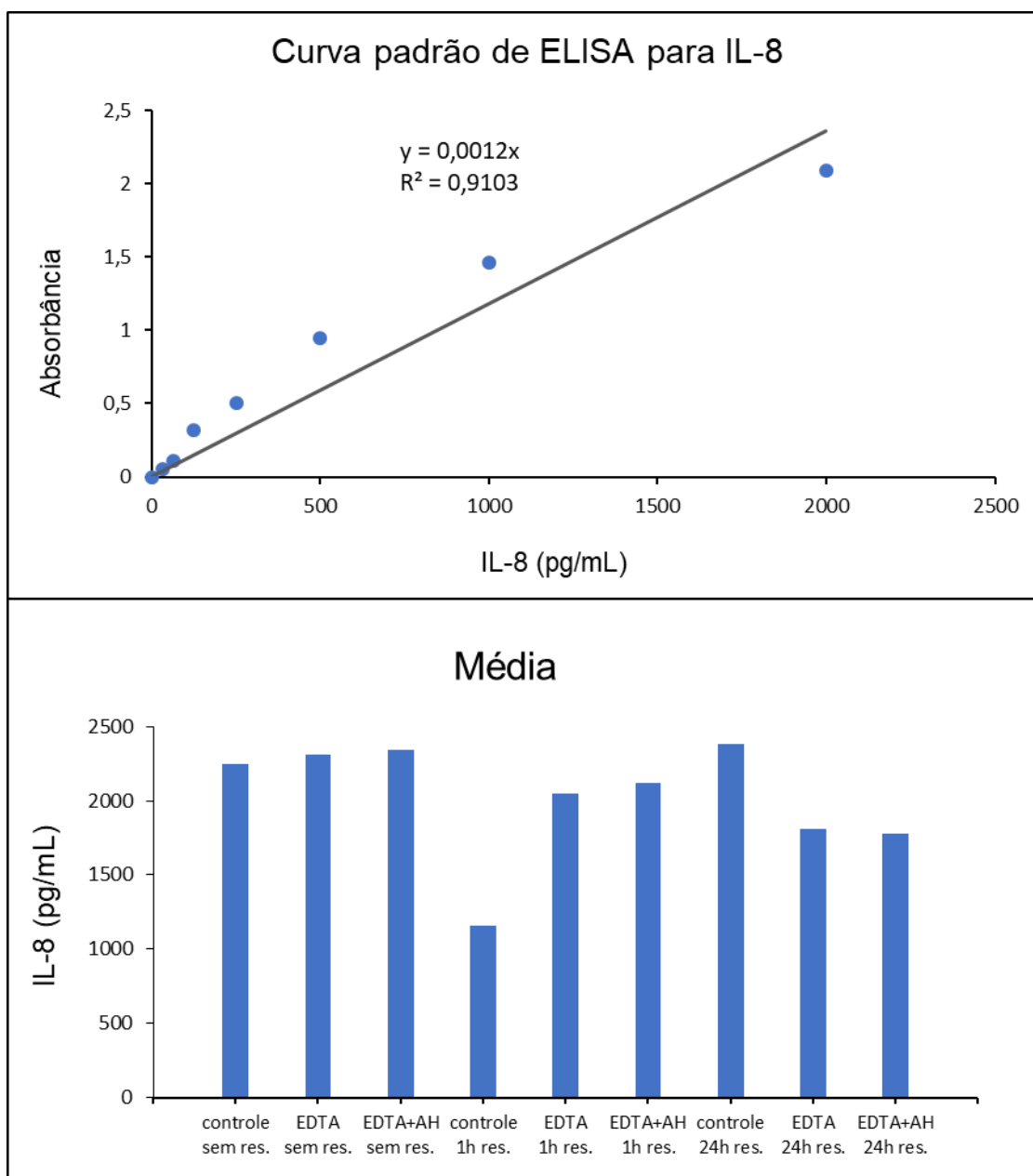
Figura 20 – Gráficos de curva padrão e média para a IL-6 em células de PDLF



Fonte: Microsoft Excel.

A figura 21 apresenta o padrão de expressão da interleucina 8. Observa-se que para os grupos sem ressecamento não houve diferenças na expressão desta interleucina quantos aos tratamentos em relação ao seu grupo controle. Para o grupo 1 h de ressecamento, os tratamentos EDTA e EDTA+AH aumentaram a expressão desta citocina em relação ao seu controle. Para o grupo 24h de ressecamento, os tratamentos com EDTA e EDTA+AH reduziram a expressão da IL-8 em relação ao seu grupo controle.

Figura 21 – Gráficos de curva padrão e média para a IL-8 em células de PDLF

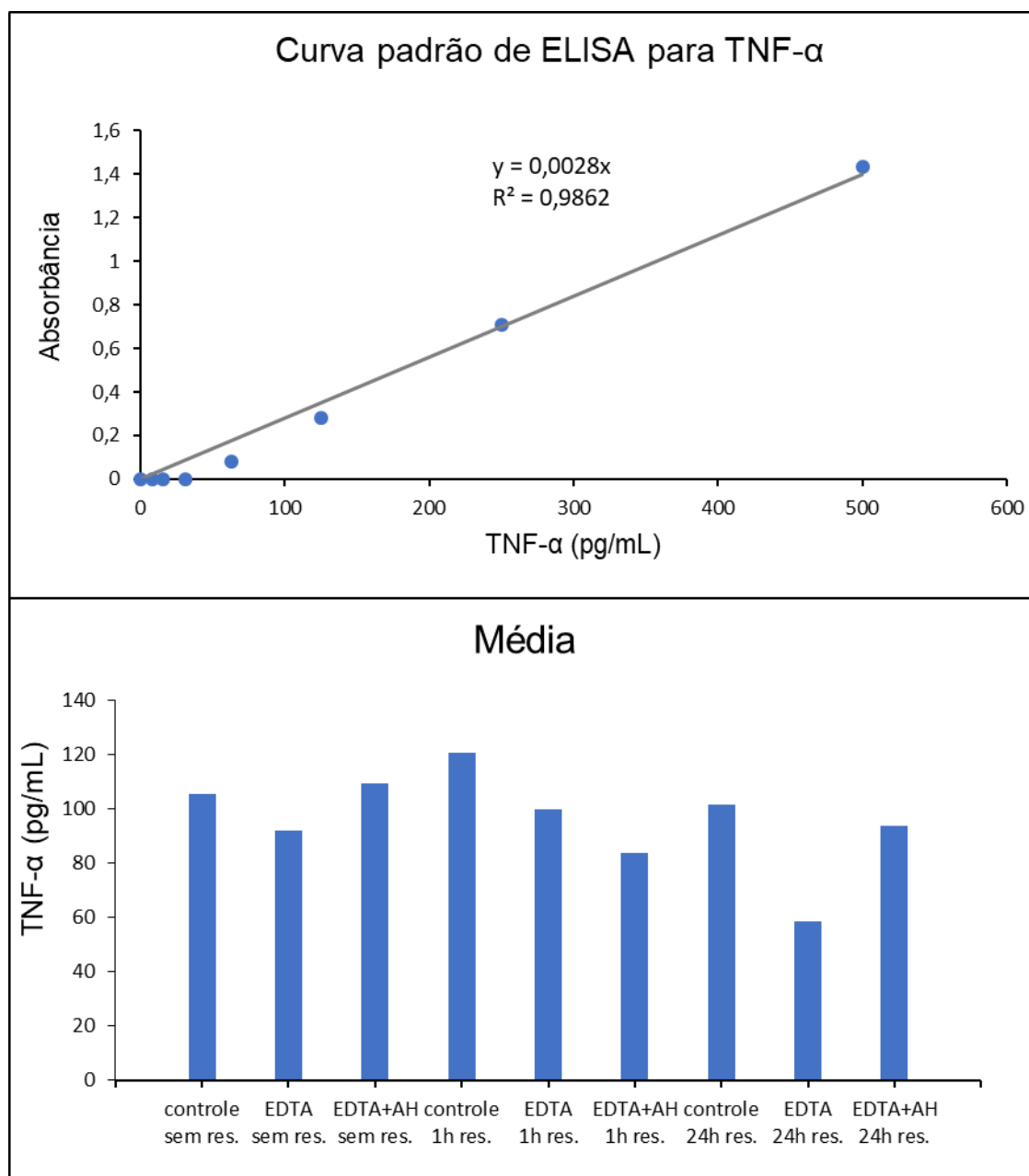


Fonte: Microsoft Excel.

Na figura 22 estão apresentados o padrão de expressão do TNF- α . Observa-se que para os grupos sem ressecamento não houve diferenças na expressão desta citocina quanto aos tratamentos. Para o grupo 1 h de ressecamento, os tratamentos EDTA e EDTA+AH reduziram a expressão desta citocina em relação ao grupo controle. Para o grupo 24h de ressecamento, o tratamento com EDTA mostrou maior

redução na expressão do TNF- α , quando comparado aos demais grupos.

Figura 22– Gráficos de curva padrão e média para o TNF- α em células de PDLF



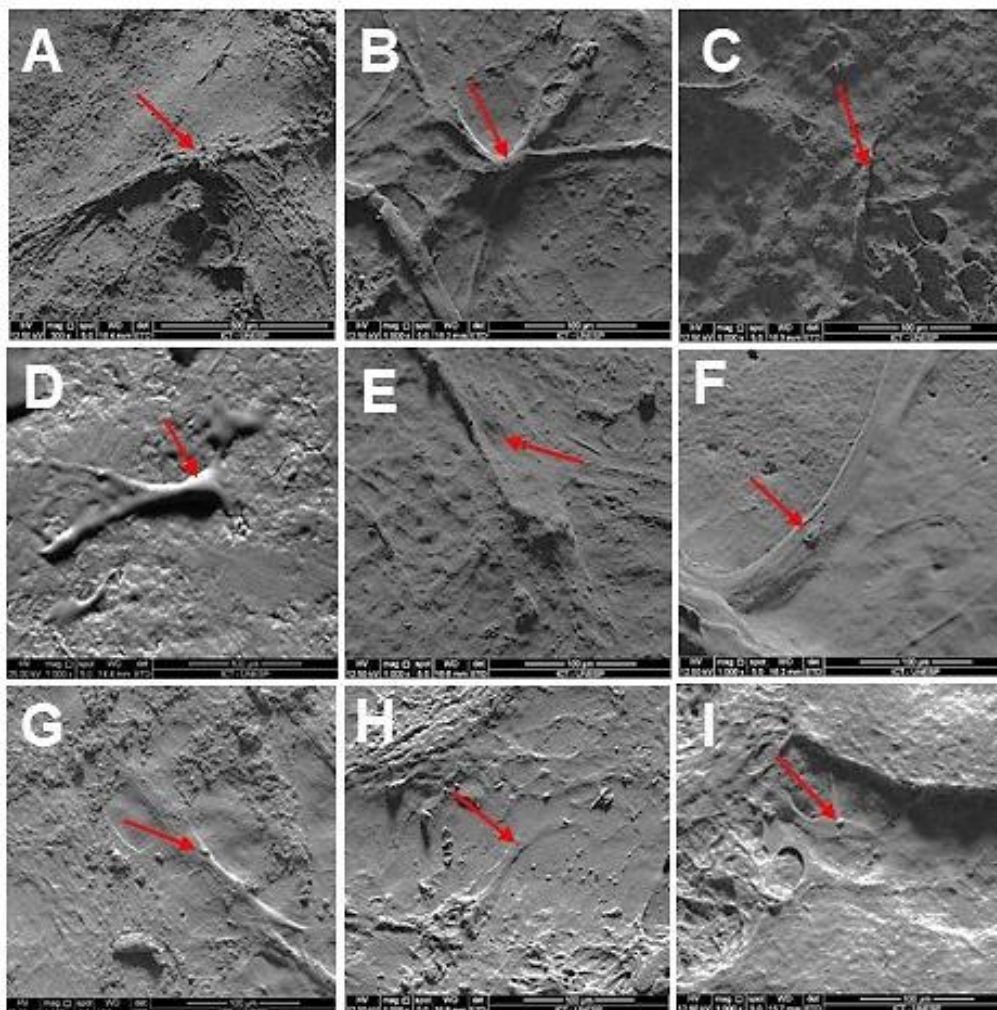
Fonte: Microsoft Excel.

5.3 Imagens ilustrativas da adesão celular por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens ilustrativas da adesão de fibroblastos na superfície dos discos de dentina com cimento, de acordo com os tratamentos de superfície estão representadas na figura 23.

Verifica-se na figura 23 que houve adesão celular em todos os grupos, com e sem ressecamento da superfície radicular diante de todos os tratamentos preconizados.

Figura 23 – Fotografia ilustrativa da adesão de fibroblastos na superfície do cimento nos discos de dentina e cimento dos grupos sem ressecamento, 1 h e 24h de ressecamento. Imagem por MEV - aumento 1000x



Legenda: grupo sem ressecamento da superfície radicular: A) controle; B) EDTA 17%; C) EDTA 17% e ácido hialurônico; grupo 1 h de ressecamento: D) controle; E) EDTA 17%; F) EDTA 17% e ácido hialurônico; grupo 24 h de ressecamento: G) controle; H) EDTA 17%; I) EDTA 17% e ácido hialurônico. Seta vermelha: núcleo do fibroblasto.

Fonte: MEV.

6 DISCUSSÃO

6.1 Discussão da Metodologia

Os métodos de estudo *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo* tais como limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos mais facilmente, e além do período de teste ser, em muitos casos, mais curto. O problema da extrapolação dos dados obtidos *in vitro* para a aplicação clínica dos biomateriais pode ser superado pelo uso de materiais de referência apropriados, atualmente em uso em clínicas (Rogerio et al., 2003).

Estudos com estes métodos demonstraram que os testes com culturas celulares podem ser utilizados com sucesso, pois são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis para a execução do estudo de biocompatibilidade *in vitro* (Schwarze et al., 2002; Brackett et al., 2010).

Existem vários métodos *in vitro*, para avaliar a toxicidade de biomateriais, utilizando-se culturas celulares. Estes testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais (Cruz et al., 1987; Guess et al., 1965; Bin et al., 2012; Camargo et al., 2014; Silva GO et al., 2016; Martinho et al., 2017).

O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular, que pode ser evidenciado com auxílio de corantes solúveis em água e que passa através da membrana celular, concentrando-se nos lisossomos, fixando-se por ligações eletrostáticas hidrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal. Portanto é possível distinguir entre células vivas e danificadas ou mortas, pela medida da intensidade de cor da cultura celular (Ciapetti et al., 1996).

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

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

A presença de vitalidade das células do ligamento periodontal (PDL) aderidas à raiz é o fator mais importante correlacionado a um bom prognóstico a longo prazo dos dentes avulsionados (Andreasen et al., 1981). Os dentes que sofrem avulsão e são mantidos em condições de ressecamento estão associados à reabsorção radicular inflamatória que se desenvolve como resultado da falta de PDL viável (Dos Santos et al., 2009). Tronstad em 1988, já relatou que "a reabsorção radicular progressiva pode ser tratada com uma alta taxa de sucesso, enquanto que a reabsorção radicular de reposição ainda permanece além da nossa competência clínica". O foco deste estudo foi direcionado para a preservação das células PDL, procurando avaliar como o tempo extraoral pode interferir nesta vitalidade para assim aumentar a regeneração do ligamento periodontal.

O ensaio de ELISA, um teste imunoenzimático que se baseia na interação antígeno-anticorpo para detecção de anticorpos específicos, foi utilizado neste estudo com o objetivo de se detectar a presença ou não de algumas citocinas pró e anti-inflamatórias expressas pelos fibroblastos após o contato com determinadas substâncias que foram utilizadas na tentativa de melhorar a adesão destas células sobre a superfície radicular, em casos de reimplante dentário.

Diomedes et al., em 2014, utilizaram o teste de ELISA para detectar citocinas próinflamatórias após a exposição de células à um cimento à base de metacrilato,

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

Os processos inflamatórios são mediados pelas citocinas pró-inflamatórias que estão envolvidas em todas as etapas da inflamação desde a iniciação até a sua resolução. As citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 e TNF- α , induzem as características clássicas da inflamação. Portanto, testamos os níveis de IL-6, IL-8, IL-1 β e TNF- α de acordo com o tempo de ressecamento da superfície radicular.

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

6.2 Discussão dos Resultados

Nos últimos anos pesquisas têm sido dirigidas em busca de um tratamento eficaz para a superfície radicular de dentes que sofreram avulsão traumática e que foram reimplantados tardiamente, na esperança de que os danos causados às estruturas de suporte, ou seja, ao ligamento periodontal, sejam mínimos ou nulos (Kin, Yang, 2011).

Neste estudo pode-se verificar que houve aumento da viabilidade dos fibroblastos quando se aplicou o EDTA 17% associado ao ácido hialurônico, tanto nos grupos sem ressecamento como nos tempos de 1h e 24h de ressecamento da superfície dos discos. Pang et al., 2014 verificaram que o EDTA induzia a proliferação celular e a diferenciação de odontoblastos e osteoblastos apenas no grupo em que as células foram colocadas em contato direto com as superfícies de dentina tratadas com EDTA demonstrando o efeito benéfico desta substância na endodontia regenerativa. Como neste estudo além da dentina, o cimento também foi preservado, isto parece explicar a melhora da viabilidade dos fibroblastos e consequentemente a maior adesão na superfície radicular. Blomlöf et al., 2000 também demonstraram melhora significativa da cicatrização periodontal em relação ao tratamento da superfície com EDTA, com menor recessão gengival e profundidade de sondagem.

Por meio de análise imunohistoquímica, Trevino et al. (2011), avaliando a citotoxicidade de substâncias irrigadoras sob cultura de células da papila apical, observaram que o EDTA 17% apresentou os melhores resultados de viabilidade celular quando comparado aos demais grupos. Huang et al. (2012), estudando a propriedade de molhabilidade de substâncias irrigadoras, constataram que o uso de EDTA 17% por 1 min não foi o suficiente para produzir tal efeito na superfície dentinária, e é essa propriedade que promove a sobrevivência das células e a sua adesão às estruturas (Wang et al., 2010; Ke et al., 2010). Este estudo utilizou o EDTA por 5 min para assim aumentar a molhabilidade e a sobrevivência celular. Além disso, a ação quelante do EDTA é capaz de liberar fatores de crescimento capazes de induzir a proliferação, a sobrevivência e a diferenciação celular (Roberts-Clark, Smith, 2000; Pang et al., 2014). Sendo assim, podia-se esperar que a aplicação do EDTA 17% sob a superfície cementária produzisse bons resultados.

O ácido hialurônico é um glicosaminoglicano não sulfatado e linear, consistindo em unidades repetidas de (β ,1-4) ácido glucurônico-(β ,1-3)-N-acetil glucosamina (Takeda et al., 2011) e é um componente principal da matriz extracelular (Jiang et al., 2011). Amplamente distribuído na matriz extracelular de tecidos de mamíferos (Bartold, et al, 1981; Giannobile et al., 1993) principalmente sintetizado por células mesenquimatosas (Gerdin B, Hallgren R, 1997) e responsável pela organização de

proteoglicanos estabelecendo vínculos com colágeno, fibrina, e diferentes moléculas da matriz (Chen, Abatangelo, 1999)

Foi detectado em tecidos periodontais em quantidades variáveis e é mais proeminente nos tecidos não mineralizados, como a gengiva e o ligamento periodontal, do que os mineralizados como o cemento e osso alveolar (Waddington, Embery, 2001). Nos estágios inflamatórios iniciais da cicatrização de feridas, os tecidos são muito ricos em ácido hialurônico (Oksala et al., 1995; Weigel et al., 1986; Fraser, Laurent, 1989). O hialuronano tem sido o centro de vários estudos, desde o desenvolvimento precoce de tecidos, como uma matriz óssea ativa, na diferenciação de células mesenquimais, migração e adesão, para a formação de hidroxiapatita (Toole, Gross, 1971; Toole et al., 1972; Iwata, Urist, 1973; Belsky, Toole, 1983) e tem sido usado como veículo para fatores de crescimento. A natureza hidrofílica do hialuronano cria um ambiente para a migração celular, enquanto que a eliminação de radicais livres e as propriedades de exclusão de proteínas oferecem proteção às células e às moléculas da matriz extracelular (Chen, Abatangelo, 1999). O hialuronano promove outras funções das células do sangue especialmente na resposta inflamatória, por exemplo, fagocitose e quimiotaxia (Weigel et al., 1986). Suas propriedades anti-inflamatórias tornaram-se de interesse em várias aplicações médicas, como no tratamento da radioterapia (Liguori et al., 1997), osteoartrite do joelho (Huskinson, Donnelly, 1999; Adams et al., 1995; Wu et al., 1997) e artrite reumatoide (Matsuno et al., 1999).

Em um estudo de Takeda et al. (2011) observaram que scaffolds de ácido hialurônico empregados em dentes de cachorros, foram promotores da adesão e proliferação de fibroblastos do ligamento periodontal. O ácido hialurônico (AH) pode ser empregado em scaffold devido à sua ação na funcionalidade da matriz extracelular. Produzido também pelos fibroblastos, o AH contribui significativamente na hidrodinâmica tecidual, na migração celular e na sua proliferação (Bansal et al., 2010). Foi observado em nosso estudo que o uso do ácido hialurônico juntamente com o EDTA17% promoveu melhores resultados no teste de citotoxicidade sendo, portanto, biocompatível com os fibroblastos do ligamento periodontal causando uma maior proliferação destas células na superfície radicular. Este estudo demonstrou que o ácido hialurônico foi eficiente em aumentar a viabilidade celular com o aumento do tempo de ressecamento.

Segundo Preshaw e Taylor (2011), citocinas são proteínas solúveis que se ligam às células-alvo através de receptores específicos, iniciando uma cascata de sinalização intra-celulares resultando em mudanças no fenótipo celular. São proteínas eficazes em baixas concentrações e produzidas de forma transitória atuando, primeiramente, nos tecidos onde são produzidas. As citocinas inflamatórias, como o TNF- α (fator de necrose tumoral- α), IL6 e IL-8 participam de uma importante função na modulação dos sistemas inflamatórios. São produzidas não somente pelas células imunes (linfócitos, monócitos e macrófagos), mas também por células epiteliais, endoteliais e fibroblastos (Wu et al., 2015).

A interleucina 8 é conhecida como uma citocina pró-inflamatória que participa da defesa do hospedeiro, sendo produzida por fibroblastos em resposta às bactérias periodontais e componentes bacterianos e, atua direcionando neutrófilos polimorfonucleares para o local da infecção (Sahingur, Yeudall, 2015). Wu et al. (2015) afirmam que níveis elevados de IL-8 em resposta a um estímulo patogênico representam uma situação de dano tecidual ou stress e contribuem para a resposta imune de fibroblastos. A expressão da IL-8, neste estudo nos períodos testados parecem comprovar o fato de que logo após o reimplante de um dente avulsionado ocorre uma resposta inflamatória e que com os tratamentos de EDTA e ácido hialurônico, houve melhora no grupo 24h de ressecamento. Talvez necessite de um tempo prolongado para que o organismo comece a enviar outras citocinas ao local que ajudem a modular a cascata da inflamação.

A interleucina 6 é uma outra citocina pró-inflamatória presente na injúria aguda. Participa também da reabsorção óssea e do estabelecimento de inflamação crônica em doenças periodontais, tem implicação no controle da permeabilidade vascular e na produção de colágeno, resultando no recrutamento de células inflamatórias. Ahn et al. 2016, em seu estudo verificou que uma resposta inflamatória primária às células PDLF ressecadas tiveram níveis de expressão amplificados de IL-1 β , e IL-6 à medida que o tempo extra-alveolar aumentava. Este estudo também verificou uma alta expressão desta citocina nos tempos de ressecamento avaliados e somente no grupo 24h os tratamentos EDTA e ácido hialurônico conseguiram diminuir um pouco a liberação da mesma para o local do reimplante.

A IL-1 β é uma citocina com efeitos biológicos confirmados como a reabsorção óssea, febre e indução de síntese de prostaglandinas (Preshaw, Taylor, 2011). Assim como a IL-8, a IL-1 β é um mediador pró-inflamatório que exacerba a resposta inflamatória e promove a progressão para estágios mais avançados da doença, assim como causa a perda da rede de fibra de colágeno em torno do infiltrado inflamatório devido à ativação do sistema imune local (Lin et al., 2015; Sahingur, Yeudall, 2015).

Além disso, essa citocina medeia uma variedade de processos de defesa do hospedeiro, tais como a inflamação e resposta celular contra uma lesão (Lin et al., 2015). Na presença da IL-1 β , as células do ligamento periodontal são capazes de mudar suas características fenotípicas de forma transitória e passam a mediar processos catabólicos como a reabsorção óssea (Kanzaki et al., 2002). Neste estudo houve expressão significativa desta citocina somente com o tratamento da superfície com EDTA em todos os tempos testados, e com o uso do AH houve expressão no grupo sem ressecamento. Assim como as outras interleucinas, são necessários outros estudos que confirmem a inibição desta citocina, assim como a sua ativação.

O TNF- α ou caquetina é outra citocina pró-inflamatória capaz de induzir inflamação aguda ou crônica e estimular a reabsorção óssea, induzindo a diferenciação de progenitores dos osteoclastos. Possui efeitos pleiotrópicos incluindo a ativação de leucócitos inflamatórios, modificação da permeabilidade vascular e indução da reabsorção óssea, além de estar presente em inflamações crônicas (Marinho et al., 2015). Produzida principalmente por monócitos, macrófagos e linfócitos-T e pode estimular a produção de fibroblastos (Oliveira et al., 2011). Devido à sua capacidade de modificar eventos hemodinâmicos e de causar reabsorção óssea, podemos explicar a expressão desta neste estudo em todos os períodos avaliados.

Sendo assim, concordamos com Graves et al. (2008) e Oliveira et al. (2011), quando os autores dizem que, dadas as consequências profundas da liberação de citocinas de forma descontrolada, a regulamentação destas moléculas biologicamente ativas se faz essencial para o funcionamento das respostas imune e inflamatória, uma vez que a produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias a partir da lesão pode manifestar-se sistematicamente com instabilidade hemodinâmica ou distúrbios metabólicos. O tratamento da superfície radicular com EDTA e ácido hialurônico neste primeiro momento parecem não ter contribuído para uma menor expressão, mas não

podemos esquecer que é esperado um processo inflamatório inicial frente ao reimplante seja ele imediato ou tardio.

Portanto, verifica-se que a viabilidade dos fibroblastos do ligamento periodontal foi melhor com o uso do ácido hialurônico concomitante ao EDTA 17% no tratamento da superfície de dentes simulando avulsão, podendo ser um material de escolha para casos de reimplante seja ele imediato ou tardio. Também foi observado, através da microscopia eletrônica de varredura, que houve adesão destas células na superfície radicular comprovando que os tratamentos preconizados são eficientes na tentativa de cura do periodonto. Entretanto, as citocinas pró-inflamatórias utilizadas neste estudo não modificaram sua expressão mesmo com os tratamentos propostos. Pesquisas futuras devem ser realizadas para buscar entender o completo mecanismo da inflamação quando um dente reimplantado é submetido aos tratamentos com EDTA 17% e ácido hialurônico.

7 CONCLUSÃO

Pode se concluir que:

- o ácido hialurônico associado ao EDTA 17% aumenta a viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal quando o cimento é mantido íntegro em dentes com até 24h de ressecamento da superfície radicular;
- não houve modificações significativas na expressão das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α quando a superfície radicular foi ressecada por até 24h e tratada com EDTA 17% e ácido hialurônico;
- ocorreu adesão de PDLFs na superfície radicular dos dentes com até 24 h de ressecamento;
- o tratamento da superfície radicular com EDTA 17% por 5 min e ácido hialurônico pode ser uma proposta para tratamento de dentes submetidos a reimplante tardio.

REFERÊNCIAS*

Adams ME, Atkinson MH, Lussier AJ, Schulz JI, Siminovitch KA, Wade JP et al. The role of viscosupplementation with hylan G-F 20 (Synvisc) in the treatment of osteoarthritis of the knee: a Canadian multicenter trial comparing hylan G-F 20 alone, hylan G-F 20 with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and NSAIDs alone. *Osteoarthritis Cartilage*.1995;3(4):213–25.

Ahn HJ, Nam OH, Lee HS, Kim EC, Cohenca N, Choi SC. Expression of inflammatory cytokines and MMPs on replanted teeth at different extra-alveolar time: an ex vivo and in vivo study. *Int J Paediatr Dent*. 2016 Jul;26(4):301-9. doi: 10.1111/ipd.12211.

Andreasen JO, Hjorting-Hansen E. Replantation of teeth. I. Radiographic and clinical study of 110 human teeth replanted after accidental loss. *Acta Odontol Scand*. 1966 Nov;24(3):263–86.

Andreasen JO. The effect of extra-alveolar period and storage media upon periodontal and pulpal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Int J Oral Surg*.1981 Feb;10(1):43–53. doi: 10.1016/S0300-9785(81)80007-5.

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

Bai J, Qin M, Zhao YM, Huang MW, Ji AP. Chemical removal of necrotic periodontal ligament on delayed replanted teeth by sodiumhypochlorite: morphological analysis and microhardness indentation test of cementum. *Int Endod J*. 2016 Apr;49(4):393-401. doi: 10.1111/iej.12467.

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

Barbizam JV, Massarwa R, da Silva LA, da Silva RA, Nelson-Filho P, Consolaro A, et al. Histopathological evaluation of the effects of variable extraoral dry times and enamel matrix proteins (enamel matrix derivatives) application on replanted dogs' teeth. *Dent Traumatol*. 2015 Feb;31(1):29-34. doi: 10.1111/edt.12131.

Bartold PM, Wiebkin OW, Thonard JC. Glycosaminoglycans of human gingival epithelium and connective tissue. *Connect Tissue Res*.1981;9(2):99–106.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jan 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bastone EB, Freer TJ, McNamara JR. Epidemiology of dental trauma: a review of the literature. *Aust Dent J*. 2000 Mar;45(1):2–9.

Bastos JV, Silva TA, Colosimo EA, Côrtes MI, Ferreira DA, Goulart EM, et al. Expression of inflammatory cytokines and chemokines in replanted permanent teeth with external root resorption. *J Endod*. 2017 Feb;43(2):203-9. doi: 10.1016/j.joen.2016.10.018.

Belibasakis GN, Thurnheer T, Bostanci N. Interleukin-8 responses of multi-layer gingival epithelia to subgingival biofilms: role of the “red complex” species. *PLoS One*. 2013 Dec 10;8(12):e81581. doi: 10.1371/journal.pone.0081581.

Belsky E, Toole BP. Hyaluronate and hyaluronidase in the developing chick embryo kidney. *Cell Differ*. 1983;12(2):61–6.

Bin CV, Valera MC, Camargo SE, Rabelo SB, Silva GO, Balducci I, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2012 Apr;38(4):495-500. doi: 10.1016/j.joen.2011.11.003.

Bogović A, Nižetić J, Galić N, Zelježić D, Micek V, Mladinić M. The effects of hyaluronic acid, calcium hydroxide and dentin adhesive on rat odontoblasts and fibroblasts. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2011 Jun; 62(2):155–61. doi: 10.2478/10004-1254-62-2011-2076.

Bohl KS, Shon J, Rutherford B, Mooney DJ. Role of synthetic extracellular matrix in development of engineered dental pulp. *J. Biomater Sci Polym Ed*. 1998;9(7):749–64.

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

Blomlöf L, Bergman E, Forsgårdh A, Foss L, Larsson A, Sjöberg B, et al. A clinical study of root surface conditioning with an EDTA gel. I. Nonsurgical periodontal treatment. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2000 Dec;20(6):560-5.

Brackett MG, Messer RL, Lockwood PE, Bryan TE, Lewis JB, Bouillaguet S, et al. Cytotoxic response of three cell lines exposed in vitro to dental endodontic sealers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010 Nov;95(2):380-6. doi: 10.1002/jbm.b.31727.

Brun P, Cortivo R, Zavan B, Vecchiato N, Abatangelo G. In vitro reconstructed tissues on hyaluronan-based temporary scaffolding. *J Mater Sci Mater Med*. 1999 Oct-Nov;10(10/11):683-8.

Brun P, Dickinson SC, Zavan B, Cortivo R, Hollander AP, Abatangelo G. Characteristics of repair tissue in second-look and third-look biopsies from patients treated with engineered cartilage: relationship to symptomatology and time after implantation. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(6):132. doi: 10.1186/ar2549.

Çalt S, Serper A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. *J Endod*. 2002

Jan;28(1):17-9.

Camargo CH, Oliveira TR, Silva GO, Rabelo SB, Valera MC, Cavalcanti BN. Setting time affects in vitro biological properties of root canal sealers. *J Endod*. 2014 Apr;40(4):530-3. doi: 10.1016/j.joen.2013.08.009.

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

Chen WY, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair Regen*. 1999;7(2):79–89.

Ciapetti G; Granchi D; Verri E; Savarino L; Cavedagna D; Pizzoferrato A. Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. *Biomaterials*.1996 Jul;17(13):1259-64.

Consolaro. Inflamação e reparo:um sílabo para a compreensão clínica e implicações terapêuticas. Maringá; Dental Press, 2009.

Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun*. 1991 Jul;3(7):207-12.

Cruz AS; Cuppoloni KM; Martinez CHO; Gomes LFS. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. 1987;47(1): 51-57.

Cvek M, Cleaton-Jones P, Austin J, Lownie J, Kling M, Fatti P. Effect of topical application of doxycycline on pulp revascularization and periodontal healing in reimplanted monkey incisors. *Endod Dent Traumatol*. 1990 Aug;6(4):170-6.

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

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

Dinarello CA. Inflammatory cytokines: interleukin-1 and tumor necrosis factor as effector molecules in autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol*. 1991 Dec;3(6):941-8.

Dos Santos CL, Sonoda CK, Poi WR, Panzarini SR, Sundefeld ML, Negri MR. Delayed replantation of rat teeth after use of reconstituted powdered milk as a storage medium. *Dent Traumatol*. 2009 Feb;25(1):51-7. doi: 10.1111/j.1600-9657.2008.00723.x.

Duggal MS, Toumba KJ, Russell JL, Paterson SA. Replantation of avulsed permanent teeth with avital periodontal ligaments: case report. *Endod Dent Traumatol*. 1994 Dec;10(6):282-5.

Esper HR, Panzarini SR, Poi WR, Sonoda CK, Casatti CA. Mechanical removal of necrotic periodontal ligament by either Robinson bristle brush with pumice or scalpel blade. Histomorphometric analysis and scanning electron microscopy. *Dent Traumatol*. 2007 Dec;23(6):333-9. doi:10.1111/j.1600-9657.2006.00472.x.

Fawzy El-Sayed KM, Dahaba MA, Aboul-Ela S, Darhous MS. Local application of hyaluronan gel in conjunction with periodontal surgery: a randomized controlled trial. *Clin Oral Investig*. 2012 Aug;16(4):1229-36. doi: 10.1007/s00784-011-0630-z.

Flores MT, Andreasen JO, Bakland LK, Feiglin B, Gutmann JL, Oikarinen K, et al. International Association of Dental Traumatology. Guidelines for the evaluation and management of traumatic dental injuries. *Dent Traumatol*. 2001 Oct;17(5):193-8.

Fraser JR, Laurent TC. Turnover and metabolism of hyaluronan. *Ciba Found Symp* 1989;143:41-53; discussion 53-9, 281-5.

Galler KM, D'Souza RN, Hartgerink JD, Schmalz G. Scaffolds for dental pulp tissue engineering. *Adv Dent Res*. 2011 Jul;23(3): 333-9. doi: 10.1177/0022034511405326.

Garcia JBS, Issy AM, Sakata RK. Citocinas e anestesia. *Rev Bras Anesthesiol*. 2002;52(1):86-100.

Gardin C, Vindigni V, Bressan E, Ferroni L, Nalesso E, Puppa AD, et al. Hyaluronan and fibrin biomaterial as scaffolds for neuronal differentiation of adult stem cells derived from adipose tissue and skin. *Int J Mol Sci*. 2011;12(10):6749-64. doi: 10.3390/ijms12106749.

Gerdin B, Hallgren R. Dynamic role of hyaluronan (HYA) in connective tissue activation and inflammation. *J Intern Med*. 1997;242(1):49-55.

Giannobile WV, Riviere GR, Gorski JP, Tira DE, Cobb CM. Glycosaminoglycans and periodontal disease: analysis of GCF by safranin O. *J Periodontol* 1993;64(3):186-90.

Gocmen G, Gonul O, Oktay NS, Yarat A, Goker K. The antioxidant and anti-inflammatory efficiency of hyaluronic acid after third molar extraction. *J Craniomaxillofac Surg*. 2015 Sep;43(7):1033-7. doi: 10.1016/j.jcms.2015.04.022.

Gomes MAM, Neto NCM, Bispo IGA. Interleucina-6, moléculas de adesão intercelular-

1 e microalbuminúria na avaliação da lesão endotelial: Revisão de Literatura. *Rev Soc cardiol do Rio de Janeiro*. 2009;22:398-403.

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

Guess WL, Rosenbluth SA, Schimdt B, Autian JJ. *Pharm Sci*.1965; 54(10):1545-7.

Guzmán-Martínez N, Silva-Herzog FD, Méndez GV, Martín-Pérez S, Cerda-Cristerna BI, Cohenca N. The effect of Emdogain and 24% EDTA root conditioning on periodontal healing of replanted dog's teeth. *Dent Traumatol*. 2009 Feb;25(1):43-50. doi: 10.1111/j.1600-9657.2008.00741.x.

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

Hu X, Peng Y, Sum CP, Ling J. Effects of concentrations and exposure times of sodium hypochlorite on dentin deproteinization: attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy study. *J Endod*. 2010 Dec;36(12):2008-11. doi: 10.1016/j.joen.2010.08.035.

Huang GT, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, et al. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A*. 2010 Feb;16(2):605–15. doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0518.

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

Huskisson EC, Donnelly S. Hyaluronic acid in the treatment of osteoarthritis of the knee. *Rheumatology (Oxford)*. 1999;38(7):602-7.

Inuyama Y, Kitamura C, Nishihara T, Morotomi T, Nagayoshi M, Tabata Y, et al. Effects of hyaluronic acid sponge as a scaffold on odontoblastic cell line and amputated dental pulp. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010 Jan;92(1):120-8. doi: 10.1002/jbm.b.31497.

Iwata H, Urist MR. Hyaluronic acid production and removal during bone morphogenesis in implants of bone matrix in rats. *Clin Orthop. Relat Res*. 1973;(90):236-45.

Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol Rev*. 2011;Jan;91(1):221-64. doi: 10.1152/physrev.00052.2009.

Johannsen A, Tellefsen M, Wikesjö U, Johannsen G. Local delivery of hyaluronan as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2009 Sep;80(9):1493-7. doi: 10.1902/jop.2009.090128.

Kanno CM, Saad-Neto M, Oliveira JA, Escobar CAB, Saito CTMH. The effects of one per cent sodium hypochlorite solution upon the periodontal ligament of the rat incisors. *Arq Odontol*. 2001;37(1):35-43.

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

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

Kenny DJ, Barrett EJ, Johnson DH, Sigal MJ, Tenenbaum HC. Clinical management of avulsed permanent incisors using Emdogain: initial report of an investigation. *J Can Dent Assoc*. 2000 Jun;66(1):21-9.

Kim SY, Yang SE. Surgical repair of external inflammatory root resorption with resin-modified glass ionomer cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011 Apr;111(4):e33-6. doi: 10.1016/j.tripleo.2010.12.004.

Kim DJ, Cha JK, Yang C, Cho A, Lee JS, Jung UW, et al. Changes in periodontium after extraction of a periodontally-involved tooth in rats. *J Periodontal Implant Sci*. 2012 Oct;42(5):158-65. doi: 10.5051/jpis.2012.42.5.158.

Kuo TF, Huang AT, Chang HH, Lin FH, Chen ST, Chen RS, et al. Regeneration of dentin-pulp complex with cementum and periodontal ligament formation using dental bud cells in gelatin-chondroitin hyaluronan tri-copolymer scaffold in swine. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Sep;86(4):1062-8. doi: 10.1002/jbm.a.31746.

Kurihara N, Bertolini D, Suda T, Akiyama Y, Roodman GD. IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J Immunol*. 1990;144(11):4226-30.

Lang NP, Tonetti MS, Suter J, Sorrell J, Duff GW, Kornman KS. Effect of interleukin-1 gene polymorphisms on gingival inflammation assessed by bleeding on probing in a periodontal maintenance population. *J Periodontal Res*. 2000;35(2):102-7.

Liguori V, Guillemin C, Pesce GF, Mirimanoff RO, Bernier J. Double-blind, randomized clinical study comparing hyaluronic acid cream to placebo in patients treated with radiotherapy. *Radiother Oncol*. 1997;42(2):155-61. doi:S0167-8140(96)01882-8.

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

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

exposed to lipopolysaccharide. *Mediators Inflamm.* 2015;2015: 329405. doi: 10.1155/2015/329405.

Longo DL, Fumes AC, Küchler EC, Paula-Silva FWG, Filho PN, Silva LAB. Efficiency of diferente storage media for avulsed teeth in animal models: a systematic review. *Dent Traumatol.* 2017 Aug 29. doi: 10.1111/edt.12365.

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

Lustosa-Pereira A, Garcia RB, de Moraes IG, Bernardineli N, Bramante CM, Bortoluzzi EA. Evaluation of the topical effect of alendronate on the root surface of extracted and replanted teeth. Microscopic analysis on rats' teeth. *Dent Traumatol* 2006 Set;22(1):30–5. doi:10.1111/j.1600-9657.2006.00417.x.

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

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

Martinho FC, Camargo SEA, Fernandes AMM, Campos MS, Prado RF, Camargo CHR, et al. Comparison of cytotoxicity, genotoxicity and immunological inflammatory biomarker activity of several endodontic sealers against immortalized human pulp cells. *Int Endod J.* 2018;51(1):41-57. doi: 10.1111/iej.12785.

Matsuno H, Yudoh K, Kondo M, Goto M, Kimura T. Biochemical effect of intra-articular injections of high molecular weight hyaluronate in rheumatoid arthritis patients. *Inflamm Res.* 1999;48(3):154-9.

McDonald N, Strassler HE. Evaluation for tooth stabilization and treatment of traumatized teeth. *Dent Clin North Am.* 1999 Jan;43(1):135-49, vii.

Mooney DJ, Powell C, Piana J, Rutherford B. Engineering dental pulp-like tissue in vitro. *Biotechnol Prog.* 1996 Nov-Dec;12(6):865-8. doi: 10.1021/bp960073f.

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

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

Moreira CS. Influência de diferentes tratamentos físico-químicos na adesão e viabilidade de fibroblastos de ligamento periodontal à superfície radicular simulando

dentes avulsionados. [Tese]. São José dos Campos (São Paulo): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP- Univ Estadual Paulista; 2016.

Nasser MW, Raghuwanshi SK, Grant DJ, Jala VR, Rajarathnam K, Richardson RM. Differential activation and regulation of CXCR1 and CXCR2 by CXCL872 monomer and dimer. *J Immunol*. 2009 Sep 1;183(5):3425-32. doi: 10.4049/jimmunol.0900305.

Nyman S., Houston F., Sarhed G., Lindhe J., Karring T. Healing following reimplantation of teeth subjected to root planing and citric acid treatment. *J Clin Periodontol* 1985 Abr;12(4):294–305.

Nör J, Peters MC, Christensen JB, Sutorik MM, Linn S, Khan MK, et al. Engineering and characterization of functional human microvessels in immunodeficient mice. *Lab Invest*. 2001;81(4):453-63.

Okada N, Kobayashi M, Mugikura K. Interleukin-6 production in human fibroblasts derived from periodontal tissues is differentially regulated by cytokines and a glucocorticoid. *J Periodontal Res*. 1997;32(7):559-69.

Oksala O, Salo T, Tammi R, Hakkinen L, Jalkanen M, Inki P, et al. Expression of proteoglycans and hyaluronan during wound healing. *J Histochem Cytochem*. 1995;43(2):125-35.

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

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

Palaiologou AA, Yukna RA, Moses R, Lallier TE. Gingival, dermal, and periodontal ligament fibroblasts express different extracellular matrix receptors. *J Periodontol*. 2001 Jun;72(6):798-807. doi: 10.1902/jop.2001.72.6.798.

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

Panzarini SR, Carvalho ACP, Poi WR, Sonoda CK. Use of vitamin C in delayed tooth replantation. *Braz Dent J*. 2005;16(1):17-22. doi:/S0103-64402005000100003.

Panzarini SR, Gulinelli JL, Poi WR, Sonoda CK, Pedrini D, Brandini DA. Treatment of root surface in delayed tooth replantation: a review of literature. *Dent Traumatol*. 2008 Jun;24(3):277-82. doi: 10.1111/j.1600-9657.2008.00555.x.

Panzarini SR. Effect of the treatment of root surface-adhered necrotic periodontal ligament with propolis or fluoride in delayed rat tooth replantation. *Clin Oral Investig*. 2014 Mai;18(4):1329-33. doi: 10.1007/s00784-013-1103-3.

Prasad SS, Radharani C, Varma S, Kumar SV, Sinha S, Bijle MN. Effects of citric acid and EDTA on periodontally involved root surfaces: a SEM study. *J Contemp Dent Pract*. 2012 Jul 1;13(4):446-51.

Prescott RS, Alsanea R, Fayad MI, Johnson BR, Wenckus CS, Hao J, et al. In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *J Endod*. 2008 Apr;34(4):421-6. doi: 10.1016/j.joen.2008.02.005.

Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2011 Mar;38 Suppl 11:60-84. doi: 10.1111/j.1600051X.2010.01671.x.

Rajan P, Baramappa R, Rao NM, Pavaluri AK, P I, Rahaman SM. Hyaluronic Acid as an adjunct to scaling and root planing in chronic periodontitis. A randomized clinical trail. *J Clin Diagn Res*. 2014 Dec;8(12):ZC11-4. doi: 10.7860/JCDR/2014/8848.5237.

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

Rogero SO; Higa OZ; Saiki M; Correa OV; Costa I. Cytotoxicity due to corrosion of ear piercing studs. *Toxicol In Vitro*. 2000 Dec;14(6):497-504.

Rogero SO, Malmonge SM, Lugão AB, Ikeda TI, Miyamaru L, Cruz AS. Biocompatibility study of polymeric biomaterials. *Artif Organs*. 2003 May;27(5):424-7.

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

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

Saminathan A, Vinoth KJ, Low HH, Cao T, Meikle MC. Engineering three-dimensional constructs of the periodontal ligament in hyaluronan–gelatin hydrogel films and a mechanically active environment. *J Periodont Res*. 2013 Dec;48(6):790-801. doi: 10.1111/jre.12072.

Sasaki T, Kawamata-Kido H. Providing an environment for reparative dentine induction in amputated rat molar pulp by high molecular-weight hyaluronic acid. *Arch Oral Biol*. 1995 Mar;40(3):209-19.

Scelza MZ, Linhares AB, da Silva LE, Granjeiro JM, Alves GG. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. *Int Endod J*. 2012 Jan;45(1):12-8. doi: 10.1111/j.13652591.2011.01941.x.

Schwarze T, Leyhausen G, Geurtsen W. Long-term cytocompatibility of various endodontic sealers using a new root canal model. *J Endod*. 2002 Nov;28(11):749-53. doi:10.1097/00004770-200211000-00001.

Selvig KA, Bjorvatn K, Claffey N. Effect of stannous fluoride and tetracycline on repair after delayed replantation of root-planed teeth in dogs. *Acta Odontol Scand*. 1990 Apr;48(2):107-12.

Selvig KA, Bjorvatn K, Bogle GC, Wikesjo UM. Effect of stannous fluoride and tetracycline on periodontal repair after delayed tooth replantation in dogs. *Scand J Dent Res*. 1992 Jul;100(4):200-3.

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

Sigalas E, Regan JD, Kramer PR, Witherspoon DE, Opperman LA. Survival of human periodontal ligament cells in media proposed for transport of avulsed teeth. *Dent Traumatol*. 2004 Feb;20(1):21-8.

Silva GO, Cavalcanti BN, Oliveira TR, Bin CV, Camargo SE, Camargo CH. Cytotoxicity and genotoxicity of natural resin-based experimental endodontic sealers. *Clin Oral Investig*. 2016 May;20(4):815-9. doi: 10.1007/s00784-015-1567-4.

Söder PO, Otteskog P, Andreassen JO, Modéer T. Effect of drying on viability of periodontal membrane. *Scand J Dent Res*. 1977 Mar;85(3):164-8.

Sonoda CK, Poi WR, Panzarini SR, Sottovia AD, Okamoto T. Tooth replantation after keeping the avulsed tooth in oral environment: case report of a 3-year follow-up. *Dent Traumatol*. 2008 Jun;24(3):373-6. doi: 10.1111/j.1600-9657.2007.00522.x.

Sottovia AD, Sonoda CK, Poi WR, Panzarini SR, Lauris JR. Delayed tooth replantation after root surface treatment with sodium hypochlorite and sodium fluoride: histomorphometric analysis in rats. *J Appl Oral Sci*. 2006 Apr;14(2):93-9.

Srisuwan T, Tilkorn DJ, Al-Benna S, Abberton K, Messer HH, Thompson EW. Revascularization and tissue regeneration of an empty root canal space is enhanced by a direct blood supply and stem cells. *Dent Traumatol*. 2013 Apr;29(2):84-91. doi: 10.1111/j.1600-9657.2012.01136.x.

Takeda K, Sakai N, Shiba H, Nagahara T, Fujita T, Kajiya M, et al. Characteristics of high-molecular-weight hyaluronic acid as a brain-derived neutrophilic factor scaffold in periodontal tissue regeneration. *Tissue Eng Part A*. 2011 Apr;17(78):955-67. doi: 10.1089/ten.TEA.2010.0070.

Tartari T, Bachmann L, Maliza AG, Andrade FB, Duarte MA, Bramante CM. Tissue dissolution and modifications in dentin composition by different sodium hypochlorite

concentrations. *J Appl Oral Sci.* 2016 May-Jun;24(3):291-8. doi: 10.1590/1678-775720150524.

Tartari T, Bachmann L, Zancan RF, Vivan RR, Duarte MA, Bramante CM. Analysis of the effects of several decalcifying agents alone and in combination with sodium hypochlorite on the chemical composition of dentine. *Int Endod J.* 2017 Mar 17. doi: 10.1111/iej.12764.

Toole BP, Gross J. The extracellular matrix of the regenerating newt limb: synthesis and removal of hyaluronate prior to differentiation. *Dev Biol.* 1971;25(1):57–77.

Toole BP, Jackson G, Gross J. Hyaluronate in morphogenesis: inhibition of chondrogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972;69(6):1384-6.

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

Trope M. Root resorption of dental and traumatic origin: classification based on etiology. *Pract Periodontics Aesthet Dent.* 1998 May;10(4):515-22.

Trope M. Clinical management of the avulsed tooth: present strategies and future directions. *Dent Traumatol.* 2002 Feb;18(1):1-11.

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

Uematsu S, Mogi M, Deguchi T. Interleukin (IL)-1 beta, IL-6, tumor necrosis factor-alpha, epidermal growth factor, and beta 2-microglobulin levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 1996;75(1):562-7. doi:10.1177/00220345960750010801.

Vindigni V, Cortivo R, Iacobellis L, Abatangelo G, Zavan B. Hyaluronan benzyl ester as a scaffold for tissue engineering. *Int J Mol Sci.* 2009 Jul 3;10(7):2972-85. doi: 10.3390/ijms10072972.

Waddington RJ, Embery G. Proteoglycans and orthodontic tooth movement. *J Orthod.* 2001 Dec;28(4):281-90. doi:10.1093/ortho/28.4.281.

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

Weigel PH, Fuller GM, LeBoeuf RD. A model for the role of hyaluronic acid and fibrin in the early events during the inflammatory response and wound healing. *J Theor Biol.* 1986;119(2):219-34.

Wu JJ, Shih LY, Hsu HC, Chen TH. The double-blind test of sodium hyaluronate (ARTZ) on osteoarthritis knee. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 1997;59(2):99-106.

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

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

You HJ, Han SK, Rhie JW. Randomised controlled clinical trial for autologous fibroblast-hyaluronic acid complex in treating diabetic foot ulcers. *J Wound Care.* 2014 Nov;23(11):521-2, 524, 526-30. doi: 10.12968/jowc.2014.23.11.521.

Zandim DL, Leite FR, da Silva VC, Lopes BM, Spolidorio LC, Sampaio JE. Wound healing of dehiscence defects following different root conditioning modalities: an experimental study in dogs. *Clin Oral Investig.* 2013 Jul;17(6):1585-93. doi: 10.1007/s00784-012-0848-4.

Zavan B, Brun P, Vindigni V, Amadori A, Habeler W, Pontisso P, et al. Extracellular matrix-enriched polymeric scaffolds as a substrate for hepatocyte cultures: In vitro and in vivo studies. *Biomaterials.* 2005 Dec;26(34):7038-45. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.067.

Zervas P, Lambrianidis T, Karabouta-Vulgaropoulou I. The effect of citric acid treatment on periodontal healing after replantation of permanent teeth. *Int Endod J* 1991;24(6):317-25.

Zhu W, Zhang Q, Zhang Y, Cen L, Wang J. PDL regeneration via cell homing in delayed replantation of avulsed teeth. *J Transl Med.* 2015 Nov 14;13:357. doi: 10.1186/s12967-015-0719-2.

APÊNDICE A – Citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias

Quadro 1 – Citocinas pró-inflamatórias

Citocina	Ação	Produção Celular	Atividade
IL-1β	Pró-inflamatória	Macrófagos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais	Inflamação sistêmica, ativação da COX-2 e PGE2 (febre). Mantém a dor pós-operatória
IL-6	Pró-inflamatória	Macrófagos, monócitos, eosinófilos, hepatócitos e células da glia	Causa febre, induz e controla a síntese e liberação de proteínas da fase aguda pelos hepatócitos e promove a maturação e ativação de neutrófilos, macrófagos e linfócitos T
IL-8	Pró-inflamatória	Macrófagos, células epiteliais e células endoteliais, fibroblastos, queratinócitos, melanócitos, hepatócitos e condrócitos	Quimiotaxia para neutrófilos, promotor da angiogênese
TNF-α	Pró-inflamatória	Monócitos, macrófagos, linfócitos-T, neurônios e células da glia	Hiperálgia inflamatória e neuropática, estimula a proliferação de linfócitos-T, fibroblastos e células matadoras naturais

Fonte: Elaborada pelo autor.

ANEXO A - Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)

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



**CEUA - Comissão de Ética no
Uso de Animais**

São José dos Campos, 01 de junho de 2017

Ofício nº 02/2017-CEUA-ICT-SJC-UNESP

O protocolo intitulado "Influência do tempo de ressecamento da superfície radicular na adesão e viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal", de sua responsabilidade tendo como colaboradores:- Prof. Dr. CARLOS HENRIQUE RIBEIRO CAMARGO e Profa. Dra. MARCIA CARNEIRO VALERA, não necessita ser analisado por esta CEUA, devido a pesquisa em tela não envolver a utilização de vertebrados e sim o uso de dentes bovinos, como substrato comercialmente disponível, de acordo com a Lei nº 11.794 de 08/10/2008 – Lei "Arouca"

Atenciosamente

Profa.Dra. **PAULA CAROLINA KOMORI DE CARVALHO**
Coordenadora

MONIQUE COSTA MOREIRA FRANÇA

Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Odontologia
Restauradora
ICT-CSJC-UNESP