



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



EDUARDO DE PAULA ISHI

**EFICÁCIA DO CLORIDRATO DE
TETRACICLINA NA REMOÇÃO DA
SMEAR LAYER E NA EXPOSIÇÃO DO
COLÁGENO DA MATRIZ DENTINÁRIA**

ARARAQUARA

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



EDUARDO DE PAULA ISHI

**EFICÁCIA DO CLORIDRATO DE
TETRACICLINA NA REMOÇÃO DA
SMEAR LAYER E NA EXPOSIÇÃO DO
COLÁGENO DA MATRIZ DENTINÁRIA**

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

Orientadora

Prof^a Dr^a Mirian Aparecida Onofre

ARARAQUARA

2007

Ishi, Eduardo de Paula

Eficácia do cloridrato de tetraciclina na remoção da *smear layer* e exposição do colágeno da matriz dentinária / Eduardo de Paula Ishi. – Araraquara : [s.n.], 2007.

141 f. ; 30 cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Mirian Aparecida Onofre

1. Tetraciclina 2. Camada de esfregaço 3. Microscopia eletrônica de varredura 4. Colágeno I. Título.

EDUARDO DE PAULA ISHI

**EFICÁCIA DO CLORIDRATO DE TETRACICLINA NA REMOÇÃO DA
SMEAR LAYER E NA EXPOSIÇÃO DO COLÁGENO DA MATRIZ
DENTINÁRIA**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador Mirian Aparecida Onofre
2º Examinador Márcio Zaffalon Casati
3º Examinador Fabio André dos Santos
4º Examinador Carlos Rossa Júnior
5º Examinador José Eduardo Cezar Sampaio

Araraquara, 11 de dezembro de 2007.

Dados Curriculares

Eduardo de Paula Ishi

Nascimento:	30/9/1973 – São Paulo – SP
Filiação:	Massao Ishi e Marlene de Paula Ishi
1991-1994	Curso de Graduação em Odontologia Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Universidade Estadual de Campinas
1995-1995	Estagiário do Departamento de Prótese e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Universidade Estadual de Campinas
1998-1999	Curso de Especialização em Periodontia Fundação Araraquarense de Ensino e Pesquisa em Odontologia – FAEPO
2002-2003	Curso de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Concentração Periodontia – Nível Mestrado – Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
2004-2007	Curso de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Concentração Periodontia – Nível Doutorado – Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família,

*meus pais, **Massao Ishi (in memorian)** e*

Marlene de Paula Ishi**, e meus irmãos, **Edson de Paula

***Ishi e Mariane de Paula Ishi**, porque foi de onde eu vim*

e de onde eu recebi orientação, exemplos e os pontos de

referência que hoje fazem parte de mim e também porque

continua sendo o meu ponto de referência e a minha base

de sustentação. Visto as dificuldades que enfrento para

viver neste mundo bom, mas que, por vezes, se apresenta

frio e exigente, tenho a convicção de que, sem a minha

família, eu seria, em todos os sentidos, muito menos do

que sou hoje.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Mirian Aparecida Onofre,

minha orientadora, que me acompanhou durante os dois anos do mestrado e nestes três anos do doutorado, que não foram muito fáceis, com muitas dificuldades e situações desestimulantes que permitiram que ela demonstrasse sua força e seu equilíbrio, imprescindíveis para que pudéssemos continuar a trilhar o nosso caminho com serenidade e paz e chegar à conclusão do Curso de Doutorado. Pela sua dedicação e compreensão e pelo apoio, eu expresso aqui a minha profunda gratidão.

Ao Prof. Dr. Carlos Rossa Júnior,

admirável pessoa, professor e pesquisador, que foi quem me abriu as portas da pós-graduação. Pela sua atenção e preocupação com a minha pessoa, pelos ensinamentos, pelo apoio e pela compreensão nos momentos difíceis e pelo exemplo que representa, meus agradecimentos e minha admiração.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio,

meu companheiro de pós-graduação e de música, com quem vivi tantos momentos bons de descontração e som. Companheiro que estende a mão a quem está precisando... e do mesmo jeito que já foi com outros, foi comigo. Pela mão amiga que me foi estendida, assim como por tantas outras coisas por que passamos juntos, expresso aqui a minha gratidão.

Agradecimentos

*Aos companheiros que participaram da realização deste trabalho, **Andréa Abi Rached Dantas e Luiz Henrique Carvalho Batista**, pela convivência prazerosa e produtiva.*

*Aos professores da Disciplina de Periodontia, **Benedicto Egbert Correa de Toledo, Ricardo Samih Georges Abi Rached, Élcio Marcantonio Júnior, José Eduardo Cezar Sampaio, Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio, Silvana Regina Perez Orrico, Joni Augusto Cirelli, Carlos Rossa Júnior e Gloria Maria de Azevedo Thompson Galli**, por tudo que me propiciaram, que não foi somente a ciência periodontal, durante esses cinco anos que passei no Programa de Pós-Graduação.*

*Aos professores **Joni Augusto Cirelli, Carlos Rossa Jr e Silvana Regina Perez Orrico**, coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Periodontia da FOAr-UNESP, que exerceram a sua função durante o meu curso de doutorado, assim como a todos os membros do Conselho de Curso, por tudo o que recebi dessa pós-graduação e por poder defender esta tese de Doutorado.*

*À Faculdade de Odontologia de Araraquara, representada por sua diretora, **Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantônio**, que me proporcionou a formação no curso de pós-graduação.*

*Às funcionárias da Disciplina de Periodontia, **Maria do Rosário Bento Clemente, Maria Teresinha Galli, Maria José da Silva Miquelon, Ana***

Agradecimentos

Claudia Gregolim Miranda, pela amizade, atenção e disponibilidade e pelo carinho com que sempre me trataram.

À Regina Lúcia da Silva, secretária da Disciplina de Periodontia, que me ajudou muito durante o curso. Sua disponibilidade, atenção e seu carinho foram muito importantes nos momentos difíceis pelos quais eu passei.

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

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Maria Helena Matsumoto Komasti Leves, Ceres Maria Carvalho Galvão de Freitas, Marley Cristina Chiusoli Montagnoli, Eliane Cristina Marques de Mendonça Spera, Maria Aparecida Capella Carvalho, Odete Aparecida Camilo, Adriano Ferreira Luiz, Eliane Maria Sanches Scarso, Maria Inês Carlos, Silvia Helena Acquarone Lavras, os quais, além de me receber com um sorriso amigo, sempre foram muito prestativos e eficientes.

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

Agradecimentos

À família Hasegawa, Massaki, Tereza, Robson e Ricardo, que me acolheu e me trata como um membro da família, apoiou-me nos mais diversos sentidos, apoio esse fundamental para que eu pudesse dar continuidade à pós-graduação após a perda do meu pai.

Aos meu tios Saburo e Rosa Ishii e aos meus primos Takeshi, Akio e Kentian, que também vieram para me apoiar e me presentear com amizade e atenção após a perda do meu pai.

Ao Cirurgião-Dentista Marcelo Fernandes Pereira, que me acompanha e apóia desde quando nossa amizade começou, em 1999. Porém, foi durante estes últimos cinco anos de pos-graduação que ele mais me ajudou, me amparando tanto no lado pessoal como no profissional.

Aos meus amigos Ana Emília Farias Pontes, Fernando Salimon Ribeiro, Ricardo Vieira Garcia e Beatriz Maria Valério Lopes, com quem tive um convívio muito próximo e muito legal, dividindo aprendizado e diversão, durante todos esses anos de pós-graduação.

Ao meu novo amigo João Antonio Chaves de Souza, companheiro na condução de estudos científicos (tanto em Araraquara como em Bauru), de viagens e da mesa de bar também.

Agradecimentos

À minha terapeuta Solange Aparecida Joaquim, que, com sua competência profissional, dedicação e amor ao que faz, me ajuda a trilhar os caminhos da vida, por vezes tortuosos e espinhosos, tendo como meta o meu aperfeiçoamento como pessoa, tanto para mim como para as pessoas que me cercam.

À minha fisioterapeuta Thania Loiola Cordeiro, que, com seu conhecimento e sua dedicação, me trouxe tanto bem-estar, corrigindo minha postura e cuidando do meu pescoço que vivia “travado”. Meu muito obrigado à atenção e à dedicação a mim dispensadas.

Aos meus colegas Aline Cavalcante Viana, Ana Emília Farias Pontes, Ana Lucia Roselino Ribeiro, Andréa Abi Rached Dantas, Beatriz Maria Valério Lopes, Carla Raquel Fontana, Carlos Augusto Nassar, Daniela Gonçalves, Daniela Leal Zandim, Daniela Spirandeli, Elizangela Partata Zuza, Fábio Renato Manzolli Leite, Fernanda Bello, Fernando Salimon Ribeiro, Gabriela Giro, Ivy Kiemle Trindade, Joseane Maria Dias Bosco, Juliana A. N. de Moraes, Juliana Rico Pires, Marina Montosa Belluci, Mauricio Ribeiro Costa, Milton Mantovani Junior, Patrícia O. Nassar, Rafael Sartori, Rafael Silveira Faeda, Rafaela Fernanda Mello, Ricardo Vieira Garcia, Ricardo Andrés L. Del Barrio, Roberta Grasselli Batitucci, Roberto Sales e Pessoa, Rodrigo Cavassim, Romeu B. Fernandez Filho, Rubens Spin Neto, Sabrina

Agradecimentos

Garcia de Aquino, Vanessa Camila da Silva, Wagner Nunes de Paula, Yeon Jung Kim, pela convivência, pelo companheirismo e pela amizade.

*À minha mãe, **Marlene de Paula Ishi.***

Aqui vou me referir a ela como mãe, como amiga e companheira de toda uma vida, que sempre me apoiou e acompanhou desde quando eu esquecia algum material pra escola e ela ia levar; me acompanhava quando eu ia ver guitarras pra comprar; me auxiliou na coleta de dados do trabalho científico defendido no meu mestrado; participa do meu tratamento psicológico (com eventuais participações nas sessões de terapia); enfim, em todos os momentos ela esteve ao meu lado me apoiando. E agora, na conclusão do doutorado, me emprestou dinheiro, muito dinheiro, para que eu pudesse comprar o presente que resolvi me dar pela conclusão da pós-graduação – e fez isso a contragosto, pois não queria me ver em cima de uma motocicleta – mais uma vez me apoiando e priorizando o meu gosto e a minha vontade.

*À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP**, que proporcionou minha formação profissional. Mais do que ser fonte de conhecimento, me apontou o caminho da excelência.*

*À **CAPES**, pelo apoio financeiro.*

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

Talvez as palavras rebuscadas e profundas de um Carlos Drummond de Andrade ou de algum filósofo grego pudessem ser mais prazerosas e até mesmo mais úteis de se ler. Porém, já que aqui o intuito é o de expressar as minhas idéias e os meus sentimentos, vou escrever alguma coisa. Espero que estas palavras possam, de alguma forma, servir a alguém que venha a experimentar situações e/ou sentimentos semelhantes aos meus:

“A noção de que não se pode ser tudo o que se gostaria de ser não é das mais prazerosas; entretanto essa noção pode ser importante para o ser humano, mostrando que, na vida, tudo (ou pelo menos grande parte das coisas) tem o seu limite. Três coisas amenizaram os danos quando dos meus choques contra as minhas limitações: a percepção de que a natureza não nos deu somente limitações, mas qualidades também, a de que existem pessoas que nos tem apreço e que nos amparam quando necessário e, por último, porém não menos importante, a de que podemos extrair paz e conforto da convicção de que aquela é uma limitação real (que pode, um dia, vir a ser transposta) e não o produto de displicência ou de falta de empenho.”

Epígrafe

Considero que, durante a minha estada na Faculdade de Odontologia de Araraquara, fui tratado com amor e vou sentir muitas saudades desta que, durante mais de cinco anos, foi a minha segunda casa. Aqui vai um trecho bíblico transcrito em um romance que li há um tempo:

Love is always patient and kind, it's never jealous

Love is never boastful or conceited

It's never rude or selfish

It does not take offense and is not resentful

Love takes no pleasure in other people's sins, but delights in the truth

It's always ready to excuse, to trust, to hope and to endure whatever comes

Love never comes to an end...

Corinthians 13:4-8

Epígrafe

Por vezes presenciei situações nas quais discussões acadêmicas me pareceram transformadas em disputas pessoais, nas quais imperaram o orgulho e a intransigência. Acredito que discussões acadêmicas são momentos de fraternidade, quando o conhecimento é dividido e multiplicado, já que todos ensinam e aprendem ao mesmo tempo. Transcrevo aqui um trecho do livro de Eduardo Giannetti, chamado *Felicidade*:

“As qualidades de uma boa conversa deveriam ser a polidez sem fingimento, a franqueza sem rispidez, a erudição sem pedantismo, o rigor sem aridez e, sobretudo, a disposição sincera de cooperar na busca do saber...”

Sumário

Resumo	18
Abstract	21
1 Introdução	23
2 Revisão da Literatura	29
2.1 Histórico e bases biológicas da biomodificação.....		30
2.2 O cloridrato de tetraciclina.....		37
2.3 Estudos in vitro utilizando microscopia eletrônica de varredura....		39
2.4 Tabela com a síntese dos estudos in vitro utilizando microscopia eletrônica.....		49
3 Proposição	52
4 Material e Método	54
5 Resultado	75
6 Discussão	84
7 Conclusão	103
8 Referências	105
Anexo 1	122
Anexo 2	124
Anexo 3	140

RESUMO

Resumo

Ishi EP. Eficácia do cloridrato de tetraciclina na remoção de *smear layer* e na exposição de colágeno da matriz dentinária [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2007.

Resumo

A remoção da *smear layer* e a exposição da matriz colágena da dentina de superfícies radiculares desprovidas de sua inserção conjuntiva tem o potencial de auxiliar o tratamento e/ou a regeneração periodontal. O objetivo deste estudo in vitro foi avaliar, por meio de microscopia eletrônica de varredura, a remoção da *smear layer* e a exposição da matriz colágena da dentina produzidas pela aplicação de cloridrato de tetraciclina (TTC-HCl). O cemento radicular das amostras foi removido com fresas diamantadas, processo seguido de raspagem e alisamento radicular com cureta. As 450 amostras foram divididas em 10 grupos: controle (soro fisiológico) e os que compreendiam a aplicação de TTC-HCl nas concentrações: 10mg/ml, 25mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml, 100mg/ml, 125mg/ml, 150mg/ml, 200mg/ml e 250mg/ml. Todos os grupos receberam essa aplicação de diferentes formas (passiva, pincel e fricção) e em diferentes tempos (1, 2 e 3 minutos). A avaliação foi feita por um examinador treinado, calibrado e que não conhecia o grupo ao qual as amostras pertenciam, utilizando o índice de Sampaio (1999) modificado para este estudo. Os dados foram analisados pelos testes de Kruskal-Wallis e de Dunn. As concentrações de 50mg/mL e 75mg/mL aplicadas

por fricção e por pincelamento foram as mais efetivas na remoção de *smear layer* e na exposição de colágeno. O modo de aplicação passivo mostrou-se inferior aos demais ($p=0,0001$) com relação aos mesmos parâmetros, assim como o tempo de aplicação de 1 minuto também foi inferior em relação aos demais ($p=0,002$). Concluiu-se que as concentrações de 50mg/mL e 75mg/mL aplicadas por pincelamento ou fricção durante 2 ou 3 minutos foram as mais efetivas.

Palavras-chave: Tetraciclina; camada de esfregaço; microscopia eletrônica de varredura; colágeno.

ABSTRACT

Abstract

Ishi EP. Smear layer removal and collagen fibers exposure by tetracycline hydrochloride conditioning [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2007.

Abstract

Smear layer removal and collagen fibers exposure may improve periodontal treatment and regeneration. This in vitro study assessed smear layer removal and collagen fibers exposure after application of tetracycline hydrochloride (TTC-HCl) on root surfaces by means of scanning electron microscopy. Root cementum was removed with diamond burs followed by scaling and root planning. Four hundred and fifty samples were divided into 10 groups: control (application of saline) and application of TTC-HCl 10mg/ml, 25mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml, 100mg/ml, 125mg/ml, 150mg/ml, 200mg/ml and 250mg/ml. The TTC-HCl application was performed in all groups in 3 different ways (passive, brushing and burnishing) and in 3 different times (1, 2 and 3 minutes). A previously trained, calibrated and blind examiner evaluated the photomicrographs using the Sampaio index (1999) modified for this study. Statistical analysis was performed by Kruskal-Wallis and Dunn tests. The 50mg/mL and 75mg/mL concentrations applied by burnishing or brushing were the most effective in smear layer removal and collagen fibers exposure. Both, the passive mode of application ($p=0.0001$) and 1-minute time of application ($p=0,002$) were the less effective. In conclusion, the 50mg/mL and 75mg/mL concentrations applied by brushing or burnishing during 2 or 3 minutes were the most effective.

Keywords: tetracycline; smear layer; scanning electron microscopy; collagen.

1 INTRODUÇÃO

1 Introdução

Superfícies radiculares que perderam a sua inserção periodontal apresentam alterações como a hipermineralização^{24,104} e a contaminação do cimento e da dentina por bactérias^{2,33} e toxinas bacterianas^{21,30,54,65,66}. O tratamento mecânico dessas superfícies consiste na raspagem e no aplainamento radicular com curetas manuais ou ultrassom, procedimento esse que produz a *smear layer*^{6,71,85}. Esta possui aproximadamente 5µm de espessura, deposita-se sobre a dentina radicular e é composta de remanescentes de cálculo, placa bacteriana, dentina e cimento contaminados. Estudos sugerem que a *smear layer* interposta entre a raiz e o tecido conjuntivo impede a ligação entre o coágulo sanguíneo e a superfície radicular⁶ e pode servir de barreira física ao restabelecimento da inserção periodontal³⁶.

A biomodificação radicular envolve o tratamento químico das superfícies radiculares desprovidas de inserção periodontal visando a remoção da *smear layer* e a desmineralização da superfície radicular, expondo o colágeno da matriz dentinária, com o objetivo de melhorar o padrão de cicatrização, regenerando total ou parcialmente os tecidos periodontais perdidos. Acredita-se que a biomodificação tenha o potencial de otimizar a regeneração dos tecidos periodontais. Diversos mecanismos foram propostos, entre eles a indução da cementogênese^{75,77}, a estabilização do coágulo de fibrina^{72,103}, a interdigitação do colágeno do conjuntivo gengival com o da estrutura dental⁸⁶, a otimização da

quimiotaxia, da adesão, da viabilidade e do crescimento de fibroblastos sobre superfícies dentinárias que tiveram a sua matriz colágena exposta^{94,102,103}.

Entre os agentes utilizados na biomodificação radicular, figura o cloridrato de tetraciclina, que é um antibiótico bacteriostático de largo espectro que inibe a síntese protéica⁷⁴ e é capaz de remover a *smear layer*^{43,57,59,85}. Além disso, outras propriedades do cloridrato de tetraciclina que justificariam o seu uso na terapia periodontal são: exposição da matriz colágena da estrutura dental^{17,35,44,51} e, por conseqüência, a promoção de adesão e crescimento de fibroblastos (e inibição de queratinócitos) sobre a mesma⁹⁴; efeito antimicrobiano contra periodontopatógenos^{48,91}; produção de superfícies com afinidade por fibronectina⁹⁴; capacidade de adsorver à superfície dental e de ser liberado lentamente (substantividade)⁷; inibição da produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) por monócitos estimulados com cimento proveniente de dentes com periodontite⁸⁸; inibição de enzimas colagenolíticas associadas à destruição dos tecidos periodontais (MMPs)^{1,100,101}; capacidade de inibir a produção de óxido nítrico sintetase^{25,61}; promoção da estabilização do coágulo sanguíneo¹⁰ e inibição da reabsorção óssea induzida pelo hormônio da paratireóide³⁴. Entretanto, dependendo da concentração da solução, o cloridrato de tetraciclina pode ser citotóxico^{40,67}.

Assim, acredita-se que a biomodificação radicular com o cloridrato de tetraciclina possa auxiliar no tratamento da infecção, na modulação da resposta inflamatória, na modulação do processo de cicatrização periodontal por meio da descontaminação da superfície radicular, na remoção da *smear layer* e na desmineralização da superfície radicular, expondo túbulos dentinários e/ou a matriz colágena da dentina. Isso poderia facilitar a adesão e o crescimento de células dos tecidos periodontais de proteção⁹⁸ e/ou suporte⁸¹ sobre a superfície radicular biomodificada.

Estudos que verificaram in vivo o efeito da biomodificação apresentaram resultados controversos, mas em geral indicavam que a biomodificação com cloridrato de tetraciclina favorece a cicatrização dos tecidos periodontais, embora a magnitude desse benefício pareça não ser clinicamente relevante⁵⁸. Claffey et al.²² (1987) demonstraram resultados positivos em cães, enquanto o estudo de Nagata et al.⁶⁴ (2005), em macacos, não demonstrou benefícios na cicatrização dos tecidos periodontais oriundos da aplicação do cloridrato de tetraciclina em superfícies radiculares. A biomodificação radicular foi testada em humanos como coadjuvante no tratamento de sítios com perda de inserção periodontal^{4,28,95}, em procedimentos de cobertura radicular¹⁸ e em procedimentos de regeneração tecidual guiada^{56,68}, não tendo sido observados efeitos adicionais estatística/clinicamente significantes com o uso do cloridrato de tetraciclina.

No entanto, como a biomodificação radicular é influenciada tanto pelas características químicas de cada agente condicionante, como pela sua concentração^{14,43}, pela forma²³ e pelo tempo⁸⁹ com que é aplicado sobre a superfície radicular, é pertinente o desenvolvimento de estudos *in vitro* que avaliem esses fatores e determinem os melhores parâmetros a serem utilizados para a obtenção da superfície biocompatível. Isso permitirá que as controvérsias relacionadas ao benefício da biomodificação com o cloridrato de tetraciclina nos estudos *in vitro*^{35,96,102} e *in vivo*^{4,64} sejam esclarecidas, pois os estudos não apresentam uniformidade quanto aos parâmetros de concentração, tempo e forma de aplicação utilizados. Além desses fatores, a hipermineralização de superfícies radiculares expostas ao meio bucal (supra ou subgingival) pode ser importante, dificultando a desmineralização radicular e conseqüentemente a exposição da matriz colágena dental. A falta de uma definição clara nos parâmetros de aplicação do cloridrato de tetraciclina pode comprometer a efetividade da biomodificação radicular *in vivo*, haverá a presença de *smear layer* residual e a ausência ou deficiência de exposição da matriz colágena da dentina e/ou cimento. Isso poderia prejudicar a adesão do coágulo sanguíneo à superfície radicular, a ligação entre o colágeno da matriz dentinária e o dos tecidos periodontais, inibindo o potencial quimiotático para fibroblastos e prejudicando o processo de cicatrização periodontal.

Portanto, é necessário determinar *in vitro* os parâmetros mais efetivos na promoção da biomodificação radicular, possibilitando a aplicação dos mesmos *in vivo*. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar a concentração, a forma e o tempo de aplicação de cloridrato de tetraciclina mais efetivos na remoção da *smear layer*, na exposição dos túbulos dentinários e da matriz colágena da dentina e, assim, otimizar a utilização desse agente condicionante em estudos *in vivo*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 Revisão da Literatura

Este capítulo será dividido em subitens visando apresentar a literatura de forma organizada e concisa.

2.1 Histórico e bases biológicas da biomodificação radicular

A idéia de se condicionar quimicamente superfícies radiculares como abordagem terapêutica para problemas periodontais surgiu no final do século XIX^{90,105}. Estudos *in vivo*^{15,36,63,75-79} e *in vitro*^{27,29,35,72} demonstraram a plausibilidade biológica para o efeito benéfico do condicionamento ácido radicular sobre o processo de cicatrização (favorecendo a regeneração) dos tecidos periodontais.

Register^{75,76} (1973 e 1978) e Register, Burdick^{77,78} (1975 e 1976) testaram o condicionamento radicular em modelo animal utilizando ácidos clorídrico, láctico, cítrico, fosfórico, acético e fórmico e apresentaram resultados promissores com relação à cicatrização periodontal.

De acordo com a literatura, a matriz orgânica da dentina exposta pelo condicionamento é composta basicamente por colágeno tipo I. Este se liga à fibrina presente na estrutura do coágulo sanguíneo⁷², promove quimiotaxia para diversos tipos celulares (inclusive para fibroblastos)^{73,87} e serve como arcabouço para a adesão e a proliferação de fibroblastos^{29,49,76}. Diversos estudos avaliaram as modificações estruturais produzidas pelo condicionamento ácido de superfícies radiculares, bem como a forma como essas modificações podem favorecer a regeneração periodontal.

Utilizando macacos, Polson, Proye⁷² (1983) reimplantaram dentes submetidos a raspagem e alisamento radicular do terço cervical. No grupo teste, a região raspada foi condicionada com ácido cítrico e, no grupo controle, não recebeu nenhum tipo de tratamento químico. Nas amostras não condicionadas (controle), houve formação de epitélio juncional longo, e as condicionadas (teste) apresentaram ligação da fibrina do coágulo sanguíneo com a matriz orgânica dental, o que, posteriormente, deu origem à inserção conjuntiva. Os autores concluíram que o condicionamento da superfície dental promove a ligação do colágeno da matriz dental (exposto pelo condicionamento com ácido cítrico) à fibrina do coágulo sanguíneo e que essa ligação poderia impedir ou dificultar a migração apical do epitélio juncional e favorecer a formação da inserção conjuntiva.

Alguns estudos demonstraram que, após o condicionamento ácido radicular e a estabilização do coágulo sobre a superfície condicionada, ocorre a interdigitação entre o colágeno da matriz dental e o da matriz do tecido conjuntivo (retalho)^{79,86}. Em 1988, Selvig et al.⁸⁶ demonstraram, em estudo experimental não controlado em cães, por meio de microscopia eletrônica de transmissão, a ocorrência de interdigitação entre as fibras colágenas do tecido conjuntivo e as da matriz dental que foram expostas pelo condicionamento ácido. Baker et al.⁸ (2000) propuseram um modelo experimental *in vitro* para verificar a adesão de elementos sanguíneos às superfícies radiculares biomodificadas, no qual

os autores aplicavam sangue sobre amostras de dentina biomodificadas com ácido cítrico e aguardavam a coagulação. A análise ao microscópio eletrônico de varredura mostrou a adesão da rede de fibrina (do coágulo sanguíneo) à superfície radicular, e os autores inferiram que o agente condicionante incapaz de promover tal adesão nesse modelo experimental provavelmente não obteria sucesso clínico.

Alguns estudos consideraram o EDTA um biomodificador promissor por apresentar excelente capacidade de remover *smear layer* e de expor a matriz colágena dentinária trabalhando em pH neutro, conferindo ao EDTA a propriedade de não interferir com a vitalidade tecidual como fazem os agentes condicionantes ácidos^{12,13,15}. No entanto, Leite et al.⁵² (2005), avaliando a adesão do coágulo sanguíneo sobre a superfície dental tratada com EDTA, observaram que este inibiu a adsorção e a adesão de elementos sanguíneos à superfície dentinária e isso foi atribuído à propriedade do EDTA de quelar o cálcio. Backer et al.⁶ (2005) também testaram a adesão do coágulo sanguíneo sobre superfícies radiculares condicionadas com solução saturada de ácido cítrico ou com gel de EDTA 24% (PrefGel; Biora, Malmö, Sweden). O ácido cítrico foi mais eficaz em prover a adesão do coágulo sanguíneo à superfície radicular do que o EDTA 24%, e os autores inferiram que isso foi devido à menor eficiência do EDTA em remover a *smear layer* e em expor o colágeno da matriz dental.

Outro aspecto relevante é que a biomodificação radicular tem o potencial de expor moléculas bioativas associadas à estrutura dental^{31,60} ou produzir uma superfície radicular capaz de reter e liberar lentamente moléculas bioativas (sinalizadoras)^{46,69} como o fator de crescimento derivado de plaquetas³² e a proteína morfogenética óssea¹⁰⁶. Inoue et al.^{41,42} relataram ossificação endocondral ectópica produzida pela inserção de matriz dentinária desmineralizada em diversos tecidos.

King et al.⁴⁷ (1998), em estudo experimental controlado, observaram que o condicionamento da superfície radicular com ácido fosfórico 35% prévio à aplicação de proteína morfogenética do osso (bmp-2), em defeitos de fenestração em ratos, otimiza o efeito biológico dessa proteína favorecendo a cemetogênese, embora tenha efeito negativo sobre a osteogênese.

Em contrapartida, os estudos in vitro de Lowenberg et al.⁵⁵ (1986) e Fardal, Lowenberg²⁹ (1990), utilizando cultura de fibroblastos, apresentaram resultados pelos quais a necessidade de se expor a matriz orgânica da dentina para a obtenção de uma superfície receptiva ao crescimento celular é questionada.

Lowenberg et al.⁵⁵ (1986) utilizaram fragmentos de dentina obtidos a partir da secção horizontal de dentes de porco que tiveram a camada superficial externa (cimento) removida por instrumento rotatório. Metade das amostras sofreu desmineralização por imersão em EDTA 12%. Tanto o grupo de amostras desmineralizadas como o de não

desmineralizadas foram divididos em subgrupos e tratados com colagenase, pronase, tripsina, cloridrato de guanidina e calor (este último tratamento, somente para as amostras desmineralizadas). Os autores verificaram a migração, a adesão e a orientação de fibroblastos gengivais humano sobre essas amostras e observaram que a aplicação de colagenase sobre o colágeno da matriz orgânica dental (nas amostras que foram biomodificadas por EDTA) promoveu melhores índices de adesão e de orientação das células. O tratamento com o cloridrato de guanidina (que extrai proteínas e as desnatura) de amostras não desmineralizadas pelo EDTA produziu um grande aumento nos índices de adesão e orientação celular comparáveis aos índices obtidos com superfícies desmineralizadas. Os autores inferiram que as substâncias capazes de desnaturar a matriz orgânica dental têm a capacidade de produzir superfícies dentais receptivas ao crescimento celular.

Fardal, Lowenberg²⁹ (1990) estudaram, durante 21 dias, o crescimento de fibroblastos em 120 fragmentos de dentina originados de dentes saudáveis e com doença periodontal, divididos em nove grupos: 1) raízes de dentes com doença periodontal que receberam raspagem e alisamento radicular, 2) raízes de dentes com doença periodontal que receberam raspagem e alisamento radicular e condicionamento com ácido cítrico, 3) raízes de dentes com doença periodontal que não receberam tratamento, 4) raízes de dentes com doença periodontal que receberam condicionamento com ácido cítrico, 5) raízes de dentes saudáveis, 6)

raízes de dentes saudáveis que receberam condicionamento com ácido cítrico, 7) raízes de dentes saudáveis que receberam condicionamento com ácido cítrico e colagenase, 8) raízes de dentes saudáveis que receberam condicionamento com EDTA e 9) raízes de dentes saudáveis que receberam condicionamento com EDTA e colagenase. Os autores concluíram que a associação de raspagem e alisamento radicular com o condicionamento com EDTA ou ácido cítrico produziu uma superfície com biocompatibilidade comparável à da superfície não exposta à doença periodontal e que o condicionamento ácido de superfícies dentais expostas à doença não apresentou diferença de biocompatibilidade quando comparado ao de superfícies que receberam raspagem e alisamento radicular. Além disso, a exposição da matriz de colágeno da estrutura dental por si não explica a melhor biocompatibilidade, uma vez que a digestão do colágeno dental utilizando colagenase não interferiu na biocompatibilidade aferida por meio da adesão de fibroblastos às superfícies tratadas. Entretanto, é importante ressaltar que, nas amostras provenientes de dentes com doença periodontal que não receberam raspagem e condicionamento e nas amostras que receberam somente o condicionamento, houve a organização (orientação perpendicular) das células, mas esta ocorreu à distância da superfície radicular, o que é considerado um resultado desfavorável. Uma segunda observação relevante é que, até três dias de experimento, a adesão celular foi maior nas amostras que receberam raspagem e alisamento radicular e

desmineralização quando comparadas às amostras que receberam somente raspagem e alisamento radicular.

Takata et al.⁹² (1998) estudaram o efeito do extrato dentinário (extraído pelo tratamento de dentina bovina com uma solução de guanidina e EDTA) que contém a matriz orgânica dentinária, incluindo o colágeno e demais proteínas, sobre a proliferação e a diferenciação de células progenitoras de tecido ósseo de ratos, denominadas MC3T3-E1. Os resultados apontaram inibição de proliferação e diferenciação de células MC3T3-E1 pelo extrato dentinário e sugeriram que essa inibição estaria ligada à presença do fator de crescimento e diferenciação beta (TGF- β) no extrato dentinário. Os autores relataram que o efeito inibitório do extrato dentinário sobre células progenitoras do tecido ósseo pode ser importante durante a regeneração periodontal, por meio da promoção do tecido cementário e da inibição do tecido ósseo, cujo desenvolvimento poderia implicar em cicatrização por anquilose.

O estudo de Ruggeri et al.⁸² (2007) demonstrou, por meio de imunohistoquímica, que é possível expor a matriz colágena da dentina preservando a sua integridade, mesmo utilizando um agente condicionante de natureza ácida, e Backer et al.⁶ (2005) demonstraram que essa matriz protéica, provavelmente, favorece a adesão e a estabilização do coágulo sanguíneo sobre a superfície radicular.

2.2 O cloridrato de tetraciclina

O cloridrato de tetraciclina ($C_{22}H_{23}ClN_2O_8$) foi descoberto em 1945 pelo Dr. Benjamin Dugger, na Universidade Missouri–Columbia, e foi a primeira tetraciclina descoberta*. Com o intuito de não ser repetitivo, não serão citadas aqui as suas propriedades biológicas de interesse à área da periodontia, pois estas já foram apresentadas no capítulo introdução.

O estudo in vitro de Madison, Hokett⁵⁷ (1997) testou a ação da tetraciclina e de seus derivados semi-sintéticos na biomodificação radicular. Oitenta e dois blocos de dentina oriundos de dentes com doença periodontal receberam raspagem e alisamento radicular e foram divididos em sete grupos que receberam: aplicação de cloridrato de tetraciclina, ou doxiciclina, ou minociclina, ou sumicina, ou solução salina por fricção com algodão embebido nas soluções. Após o procedimento de condicionamento químico, as amostras foram lavadas com água. O grupo controle negativo foi representado por amostras que foram somente lavadas e o grupo controle positivo foi representado pelo condicionamento com ácido fosfórico 10%. Além das soluções, foram testados diferentes tempos de aplicação: 30 segundos, 1, 3, 5 e 10 minutos. Os autores concluíram que o cloridrato de tetraciclina é a formulação mais eficaz na remoção da *smear layer* e na exposição de túbulos dentinários.

*Wikipédia [acesso em 03-jul-2007]. Disponível em:
<http://en.wikipedia.org/wiki/Chlortetracycline>

Wikesjö et al.¹⁰³ (1986) e Terranova et al.⁹⁴ (1986) promoveram a desmineralização de blocos de dentina bovina por meio de imersão em cloridrato de tetraciclina nas concentrações de 10mg/ml, 25mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml, 100mg/ml, 150mg/ml, e 200mg/ml e avaliaram diversos parâmetros. O primeiro deles foi a adsorção da substância à estrutura dental, que atingiu o patamar máximo de 4,7µg/mm² já na concentração de 50mg/ml. A adsorção do cloridrato de tetraciclina à estrutura dental é um fenômeno muito importante, pois lhe confere substantividade. O segundo parâmetro foi a liberação do cloridrato de tetraciclina no meio de cultura. Nas primeiras 2 horas, 100ug foram liberados em 20 minutos, e a quantidade de cloridrato de tetraciclina liberada reduziu com o passar do tempo até atingir o patamar de 4,2µg a cada 20 minutos às 48 horas de experimento. Baseados neste achado, os autores inferiram que, por cerca de 48 horas, as concentrações de cloridrato de tetraciclina mantiveram-se acima da concentração mínima⁹ capaz de inibir muitos dos patógenos bucais. Walker et al.⁹⁹ (1981), trabalhando com cepas bacterianas provenientes de sítios periodontais doentes, determinaram in vitro que o cloridrato de tetraciclina em concentrações de 4µg/ml a 8µg/ml é capaz de inibir esses microrganismos. Outro achado interessante é que, em meio de cultura, as amostras condicionadas apresentaram inibição do crescimento bacteriano tanto na superfície dentinária como a distância, levando os autores a

inferir que a forma ativa do cloridrato de tetraciclina foi liberado das amostras para o meio de cultura.

Alguns estudos atribuem a biocompatibilidade das superfícies dentais tratadas por agentes desmineralizantes como sendo consequência da desintoxicação^{3,26,66}, sugerindo que a desmineralização é desnecessária⁵⁵. Assim, o cloridrato de tetraciclina tem a capacidade de englobar funções diversas, removendo a *smear layer* e desmineralizando a superfície dentinária (removendo toxinas depositadas em sua superfície) e exercendo com sua propriedade antimicrobiana, pode inibir a colonização bacteriana sobre a superfície radicular tratada.

2.3 Estudos in vitro utilizando microscopia eletrônica de varredura

Utilizando 40 amostras de superfície radicular de dentes bovinos, Hanes et al.³⁵ (1991) avaliaram, por meio de microscopia eletrônica de varredura, a morfologia dentinária após o condicionamento químico. Distribuíram as amostras nos seguintes grupos: 1) amostras não raspadas; 2) amostras raspadas; 3) amostras raspadas e imersas em ácido cítrico por 5 minutos e 4) amostras raspadas e imersas em cloridrato de tetraciclina 0,5% (pH 3,2). Os resultados mostraram túbulos abertos sem exposição de fibras no Grupo 1; presença de *smear layer* no Grupo 2; ausência de *smear layer*, presença de túbulos dentinários com os maiores diâmetros e fibras colágenas expostas no Grupo 3 e remoção de *smear layer* apenas em algumas amostras sem exposição de fibras colágenas no Grupo 4.

Labahn et al.⁵⁰ (1992), procurando determinar mudanças morfológicas e os efeitos do tempo e da forma de aplicação em superfícies dentinárias após o uso do ácido cítrico e do cloridrato de tetraciclina, utilizaram 40 amostras de terceiros molares impactados que receberam 5 movimentos de raspagem com curetas de Gracey. As amostras foram distribuídas ao acaso nos seguintes grupos: ácido cítrico e cloridrato de tetraciclina na concentração de 100mg/ml aplicados por gotejamento e fricção com bolas de algodão nos tempos de 30 segundos, 1, 2 e 4 minutos (testes) e amostras sem tratamento e fricção de água destilada por 4 minutos (controle). A análise das fotomicrografias revelou que os grupos testes apresentaram-se sem *smear layer*, diferente do ocorrido no grupo controle. Nos parâmetros largura e profundidade dos túbulos dentinários, o ácido cítrico causou mudanças mais extensas mostrando-se estatisticamente superior ao cloridrato de tetraciclina, não tendo havido influência do modo de aplicação, apenas do tempo de aplicação.

Os resultados de Lafferty et al.⁵¹ (1993), porém, não demonstraram a superioridade do ácido cítrico em relação ao cloridrato de tetraciclina. Os autores utilizaram amostras de dentes periodontalmente condenados que tiveram o cimento removido por fresas e receberam raspagem manual. Soluções de ambas as substâncias (ácido cítrico pH1 e solução saturada de cloridrato de tetraciclina) foram aplicadas de forma passiva por 5 minutos. Na análise descritiva da microscopia eletrônica de

varredura, verificou-se que, em amostras não tratadas, houve formação de *smear layer* e que os agentes condicionadores foram igualmente efetivos na remoção de *smear layer*, na abertura dos túbulos dentinários e na exposição de fibras colágenas.

Trombelli et al.⁹⁶ (1994) avaliaram as características de superfícies cementárias e dentinárias condicionadas com cloridrato de tetraciclina de terceiros molares impactados. As amostras nas quais o cimento foi mantido receberam raspagem com uma cureta Gracey 1-2 e, nas demais amostras, foi associada instrumentação rotatória. Cinco amostras de cada tipo de superfície (cimento ou dentina) foram distribuídas ao acaso nos seguintes tratamentos: a) soro fisiológico por 1 minuto; b) cloridrato de tetraciclina na concentração de 62,5mg/ml por 1 minuto; c) cloridrato de tetraciclina na concentração de 62,5mg/ml por 4 minutos; d) cloridrato de tetraciclina na concentração de 125mg/ml por 1 minuto; e) cloridrato de tetraciclina na concentração de 125mg/ml por 4 minutos. As substâncias foram aplicadas por fricção com bolas de algodão, trocadas a cada 30 segundos. Na análise descritiva das fotomicrografias, observou-se, no grupo de superfície cementária que recebeu tratamento com soro fisiológico (controle), amostras irregulares e amorfas, sem túbulos dentinários e fibras de Sharpey; e que as amostras tratadas com cloridrato de tetraciclina não apresentavam *smear layer*, porém que a exposição da matriz colágena não foi homogênea (ocorreu em algumas das amostras e em outras não). O tempo de aplicação e a

concentração utilizada não influíram nos resultados das superfícies recobertas por cimento. No grupo de superfícies dentinárias, observou-se *smear layer* irregular e amorfa obstruindo completamente os túbulos dentinários no Grupo "a". Nos Grupos "b" e "d", observou-se indícios de *smear layer* na abertura dos túbulos e, nos grupos "c" e "e", remoção completa de *smear layer* e presença de fibras da matriz de colágeno. Os autores inferiram que, no cimento, a exposição da matriz colágena é influenciada mais pela morfologia do cimento e pela instrumentação mecânica do que pelo condicionamento químico e que, na dentina, a exposição da matriz colágena é influenciada apenas pelo tempo de aplicação do cloridrato de tetraciclina.

Trombelli et al.⁹⁷ (1995) avaliaram as características morfológicas de superfícies dentinárias após a aplicação tópica do cloridrato de tetraciclina. Vinte e cinco amostras de dentes recém-extraídos foram distribuídas igualmente nos seguintes grupos: 1) aplicação de soro fisiológico por 1 minuto; 2) cloridrato de tetraciclina na concentração de 10mg/ml por 1 minuto; 3) cloridrato de tetraciclina na concentração de 10mg/ml por 4 minutos; 4) cloridrato de tetraciclina na concentração de 100mg/ml por 1 minuto e 5) cloridrato de tetraciclina na concentração de 100mg/ml por 4 minutos. As substâncias foram aplicadas por fricção com bolas de algodão, trocadas a cada 30 segundos. A análise descritiva da microscopia eletrônica de varredura mostrou remoção mais eficiente de *smear layer* e exposição de fibras colágenas

quando o cloridrato de tetraciclina foi aplicado por 4 minutos, independente da concentração utilizada. Os autores afirmaram que o cloridrato de tetraciclina em concentrações a partir de 10mg/ml é capaz de remover a *smear layer* e expor a matriz colágena da estrutura dental quando aplicada por fricção durante quatro minutos e inferiram que a utilização de concentrações maiores do que 10mg/ml provavelmente não traria alterações significativas à biomodificação, mas que a redução do tempo de aplicação poderia comprometê-la.

Sterrett et al.⁸⁹ (1997) estudaram o efeito da concentração e do tempo de aplicação no grau de desmineralização da dentina por cloridrato de tetraciclina utilizando amostras de molares bovinos. Setenta e duas cavidades foram criadas em três dentes com fresas diamantadas esféricas e preenchidas com solução de cloridrato de tetraciclina nas concentrações de 0mg/ml, 25mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml, 100mg/ml, 125mg/ml e 150mg/ml e ácido cítrico 30% (controle positivo), sendo as soluções mantidas nessas depressões por 1, 3 e 5 minutos. Ao término de cada período, as depressões foram secas com bolas de algodão. Estas foram, então, enviadas para análise em espectrofotômetro a fim de se determinar a quantidade de cálcio (ppm Ca^{++}), que foi o parâmetro utilizado para determinar o grau de desmineralização. Não foi observada diferença significativa nos tempos de 1, 3, e 5 minutos para as concentrações 0mg/ml, 25mg/ml e 50mg/ml e nos tempos de 3 e 5 minutos nas concentrações de 75mg/ml, 100mg/ml, 125mg/ml e

150mg/ml. O índice de desmineralização obtido com o ácido cítrico foi sempre maior do que qualquer um obtido pelo cloridrato de tetraciclina. Os resultados mostraram que uma aplicação de cloridrato de tetraciclina na concentração de 75 mg/ml por 3 minutos é igualmente efetiva na desmineralização da dentina quanto as maiores concentrações e os maiores tempos de aplicação, mas menos efetiva que a do ácido cítrico.

Em 1997, Madison, Hokett⁵⁷ testaram diversos tipos de tetraciclina na remoção de *smear layer* de superfícies dentinárias radiculares. Dentes extraídos por razões periodontais tiveram o cimento removido por fresa e receberam oito movimentos de raspagem com curetas de Gracey. As soluções utilizadas foram: cloridrato de tetraciclina na concentração de 250mg/ml (pH 1,7), doxiciclina na concentração de 100mg/ml (pH 2,2), minociclina na concentração de 100mg/ml (pH 3,8), sumicina (pH 4,4), soro fisiológico (pH 5,1) e fibra de tetraciclina (Actisite, ALZA Corporation, Palo Alto, CA). As substâncias foram aplicadas por fricção de bolas de algodão por 30 segundos, 1, 3, 5 e 10 minutos. A fibra foi enrolada na amostra e mantida num recipiente por 1, 4, 7 e 10 dias. Um índice que apresentava 5 graus de remoção de *smear layer* foi aplicado por dois examinadores calibrados para a análise das fotomicrografias. A análise estatística mostrou que a doxiciclina e a minociclina só se mostraram eficientes quando aplicadas por, no mínimo, 5 minutos, porém foram superiores à sumicina e ao soro fisiológico, que tiveram resultados similares – ambos removeram *smear layer* sem expor

túbulos. A fibra de tetraciclina foi incapaz de remover *smear layer*, enquanto o cloridrato de tetraciclina, independentemente do tempo de aplicação, removeu a *smear layer* e foi mais eficiente na promoção da biomodificação radicular.

Babay⁵ (1997) avaliou a exposição de fibras colágenas e a remoção de *smear layer* em 30 amostras de superfícies dentinárias, empregando soluções de cloridrato de tetraciclina (pH 1,8) e ácido cítrico (pH 1). As amostras foram divididas em seis grupos de acordo com o tratamento realizado: 1) irrigação salina (IS); 2) irrigação ultra-sônica (US); 3) IS, imersão em ácido cítrico por 3 minutos e IS; 4) IS, imersão em cloridrato de tetraciclina por 3 minutos e IS; 5) US, ácido cítrico e US e 6) US, cloridrato de tetraciclina e US. Após a análise das fotomicrografias, os resultados descritivos e estatísticos mostraram uma superioridade dos Grupos 5 e 6 em ambos os parâmetros, demonstrando que a irrigação ultra-sônica pode favorecer a remoção de *smear layer* e a exposição de fibras colágenas.

Também em 1997, Isik et al.⁴⁴ compararam diferentes modos de aplicação do cloridrato de tetraciclina em superfícies dentinárias de terceiros molares impactados. O cloridrato de tetraciclina na concentração de 50mg/ml foi aplicado por 5 minutos variando apenas a forma de aplicação: I) imersão; II) passiva, escoamento com auxílio de bolas de algodão encharcadas; III) fricção; IV) pincel e V) amostras não tratadas. A microscopia eletrônica de varredura mostrou que, no grupo

controle, havia presença de *smear layer*, túbulos obstruídos e ausência de fibras colágenas. Nos grupos teste, houve remoção de *smear layer*, abertura dos túbulos e exposição de fibras colágenas estatisticamente superior à do controle. Com relação ao parâmetro remoção de *smear layer*, ela foi obtida nos Grupos II e IV; a abertura de túbulos dentinários foi observada nos Grupos III e IV e somente a fricção promoveu exposição de fibras colágenas. Quanto ao grau de exposição de fibras colágenas (classificada de superficial até profunda), a fricção foi a forma de aplicação superior, recebendo escore 3 (exposição profunda de fibras colágenas). Os autores sugeriram que a fricção é a técnica de escolha, pois expõe a matriz de colágeno de forma mais eficiente.

Delazari et al.²⁷ (1999) estudaram os efeitos do cloridrato de tetraciclina na remoção de *smear layer* e na formação de rede de fibrina em dentes indicados para exodontia por razões periodontais que foram divididos em quatro grupos: 1) acesso cirúrgico, raspagem, irrigação, reposicionamento do retalho e exodontia; 2) acesso cirúrgico, raspagem, irrigação, aplicação de cloridrato de tetraciclina, reposicionamento do retalho e exodontia; 3) acesso cirúrgico, raspagem, irrigação, reposicionamento do retalho, exodontia e imersão em tripsina 1% por 20 minutos e 4) irrigação, aplicação de cloridrato de tetraciclina, reposicionamento do retalho, exodontia e imersão em tripsina 1%. O cloridrato de tetraciclina foi utilizado na concentração de 50mg/ml (pH 1,6) e aplicado por fricção com bolas de algodão por 4 minutos. A análise

descritiva da microscopia eletrônica de varredura mostrou que, nos Grupos 1 e 2, as superfícies estavam completamente cobertas por células sanguíneas. O Grupo 3 apresentou *smear layer* irregular e, no Grupo 4, foi observada remoção de *smear layer* com abertura de túbulos dentinários. Os autores concluíram que a aplicação do cloridrato de tetraciclina remove *smear layer* e não interfere na adesão de células sanguíneas.

Com o propósito de avaliar o condicionamento radicular com cloridrato de tetraciclina, Isik et al.⁴³ (2000) coletaram 48 amostras obtidas de terceiros molares recém-extraídos que foram distribuídas em grupos de acordo com a concentração (controle, 10mg/ml, 25mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml, 100mg/ml, 125mg/ml e 150mg/ml) e o tempo de aplicação (1, 3 e 5 minutos). A remoção da camada de cimento foi realizada por meio de instrumento rotatório (não se realizou a raspagem com curetas), e a aplicação do cloridrato de tetraciclina foi realizada por fricção com bolas de algodão que eram trocadas a cada 30 segundos. As fotomicrografias de áreas representativas foram enviadas a um examinador cego para os grupos aos quais pertenciam. Os parâmetros avaliados foram a presença de *smear layer* e a morfologia dos túbulos dentinários. Os resultados obtidos mostraram que, independentemente do tempo de aplicação e das concentrações utilizadas, o cloridrato de tetraciclina removeu *smear layer*.

Com o objetivo de avaliar o efeito da concentração, do tempo e do modo de aplicação do cloridrato de tetraciclina, Sampaio⁸⁵

(2001) utilizou 180 amostras provenientes de dentes humanos, que tiveram a camada de cimento removida e receberam 50 movimentos de raspagem para a formação de *smear layer*. As amostras foram distribuídas nos grupos de acordo com a concentração utilizada (soro, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%), a forma de aplicação (tópica e fricção com bolas de algodão) e o tempo de aplicação (1, 2 e 3 minutos). As fotomicrografias obtidas foram enviadas a um examinador cego para os grupos aos quais as amostras pertenciam e calibrado para os escores de remoção de *smear layer* de Sampaio⁸⁴ (1999). A análise estatística dos resultados mostrou que a concentração de 10% e a forma de aplicação por fricção, apesar da formação de *smear layer* por dissolução química, foram superiores às demais e os tratamentos mais eficientes foram a fricção na concentração de 10% por 1 ou 2 minutos e na concentração de 20% por 1 minuto.

Em 2002, utilizando a mesma metodologia, Mata⁵⁹ estudou a remoção de *smear layer* utilizando diversas concentrações do cloridrato de tetraciclina: 50mg/ml, 125mg/ml, 250mg/ml, 500mg/ml e soro como controle. Após a obtenção dos escores e de sua análise estatística, a autora verificou que as concentrações de 125mg/ml e 250mg/ml foram as mais eficazes, independente do tempo e do modo de aplicação. A fricção, apesar da formação de *smear layer* por dissolução química da dentina, foi o método mais eficiente, não tendo o tempo qualquer efeito sobre a remoção de *smear layer*.

2.4 Tabela com a síntese dos estudos in vitro que avaliaram a biomodificação com cloridrato de tetraciclina utilizando microscopia eletrônica.

Autor	Método	Resultado
Hanes et al. ³⁵ (1991)	40 amostras de dentes bovinos distribuídos nos grupos: 1) amostras não raspadas; 2) amostras raspadas; 3) amostras raspadas e imersas em ácido cítrico por 5 minutos e 4) amostras raspadas e imersas em TTC-HCl 0,5%	O ácido cítrico foi mais eficaz em promover a biomodificação. Algumas das amostras do grupo do TTC-HCl não apresentaram exposição da matriz colágena da dentina.
Labahn et al. ⁵⁰ (1992)	40 amostras de terceiros molares impactados distribuídas nos grupos: 1) ácido cítrico; 2) TTC-HCl 100mg/ml, ambos aplicados por gotejamento e fricção com bolas de algodão nos tempos de 30 segundos, 1, 2 e 4 minutos; 3) amostras sem tratamento e fricção de água destilada por 4 minutos (controle).	grupos testes apresentaram-se sem <i>smear layer</i> ; nos parâmetros largura e profundidade dos túbulos dentinários, observou-se que o ácido cítrico foi mais eficaz do que o TTC-HCl e que apenas o tempo de aplicação teve influencia sobre a biomodificação.
Lafferty et al. ⁵¹ (1993)	30 amostras de dentes com DP foram condicionadas com ácido cítrico pH 1 e com solução saturada de TTC-HCl aplicadas de forma passiva por 5 minutos.	agentes condicionadores foram igualmente efetivos na remoção de <i>smear layer</i> , na abertura dos túbulos dentinários e na exposição de fibras colágenas.
Trombelli et al. ⁹⁶ (1994)	avaliaram as características de superfícies cementárias e dentinárias de terceiros molares impactados submetidas aos seguintes tratamentos: a) soro fisiológico por 1 minuto; b) TTC-HCl 62,5mg/ml por 1 minuto; c) TTC-HCl 62,5mg/ml por 4 minutos; d) TTC-HCl 125mg/ml por 1 minuto; e) TTC-HCl 125mg/ml por 4 minutos, todas aplicadas por fricção.	Nas amostras de cimento a exposição da matriz colágena não foi homogênea. O tempo de aplicação e a concentração não influíram nos resultados. Nas amostras de dentina observou-se <i>smear layer</i> obstruindo os túbulos dentinários no Grupo "a". Nos Grupos "b" e "d", observou-se indícios de <i>smear layer</i> na abertura dos túbulos e, nos grupos "c" e "e", remoção completa de <i>smear layer</i> e exposição da matriz de colágeno, sugerindo que só o tempo de aplicação teve influencia nos resultados.

Trombelli et al. ⁹⁷ (1995)	25 amostras distribuídas nos grupos: 1) aplicação de soro fisiológico por 1 minuto; 2) TTC-HCl 10mg/ml por 1 minuto; 3) TTC-HCl 10mg/ml por 4 minutos; 4) TTC-HCl 100mg/ml por 1 minuto e 5) TTC-HCl 100mg/ml por 4 minutos, todas aplicadas por fricção.	Observaram remoção mais eficiente de <i>smear layer</i> e exposição de fibras colágenas quando o TTC-HCl foi aplicado por 4 minutos, independente da concentração utilizada.
Sterrett et al. ⁸⁹ (1997)	Setenta e duas cavidades em molares bovinos foram preenchidas com solução de TTC-HCl 0mg/ml, 25mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml, 100mg/ml, 125mg/ml e 150mg/ml e ácido cítrico 30% (controle positivo), sendo mantidas por 1, 3 e 5 minutos.	Não foi observada diferença significativa nos tempos de 1, 3, e 5 minutos para as concentrações de 0mg/ml, 25mg/ml e 50mg/ml e nos tempos de 3 e 5 minutos nas concentrações de 75mg/ml, 100mg/ml, 125mg/ml e 150mg/ml, sugerindo que o TTC-HCl 75 mg/ml aplicado por 3 minutos é tão efetivo na biomodificação quanto as maiores concentrações e os maiores tempos de aplicação.
Madison, Hokett ⁵⁷ (1997)	82 amostras distribuídas nos grupos: TTC-HCl 250mg/ml, doxiciclina 100mg/ml, minociclina 100mg/ml, sumicina, soro fisiológico e fibra de tetraciclina. Aplicação por fricção durante 30 segundos, 1, 3, 5 e 10 minutos. A fibra foi enrolada na amostra e mantida num recipiente por 1, 4, 7 e 10 dias.	O TTC-HCl, independentemente do tempo de aplicação, removeu a <i>smear layer</i> e foi mais eficiente na promoção da biomodificação.
Babay ⁵ (1997)	30 amostras divididas em seis grupos de acordo com o tratamento realizado: 1) irrigação salina (IS); 2) irrigação ultrassônica (US); 3) IS, imersão em ácido cítrico por 3 minutos e IS; 4) IS, imersão em TTC-HCl por 3 minutos e IS; 5) US, ácido cítrico e US e 6) US, TTC-HCl e US.	Observou superioridade dos grupos 5 e 6 tanto na remoção da <i>smear layer</i> como na exposição do colágeno.
Isik et al. ⁴⁴ (1997)	TTC-HCl 50mg/ml foi aplicado por 5 minutos variando apenas a forma de aplicação: I) imersão; II) passiva, escoamento com auxílio de bolas de algodão encharcadas; III) fricção; IV) pincel e V) amostras não tratadas.	remoção de <i>smear layer</i> foi obtida nos Grupos II e IV; a abertura de túbulos dentinários foi observada nos Grupos III e IV e somente a fricção promoveu exposição de fibras colágenas.

Delazari et al. ²⁷ (1999)	TTC-HCl 50mg/ml aplicado durante 4 minutos em dentes indicados para exodontia por razões periodontais que foram divididos em quatro grupos: 1) acesso cirúrgico, raspagem, irrigação, reposicionamento do retalho e exodontia; 2) acesso cirúrgico, raspagem, irrigação, aplicação de TTC-HCl, reposicionamento do retalho e exodontia; 3) acesso cirúrgico, raspagem, irrigação, reposicionamento do retalho, exodontia e imersão em tripsina 1% por 20 minutos e 4) irrigação, aplicação de TTC-HCl, reposicionamento do retalho, exodontia e imersão em tripsina 1%.	Grupos 1 e 2, as superfícies estavam completamente cobertas por células sanguíneas. O Grupo 3 apresentou <i>smear layer</i> irregular e, no Grupo 4, foi observada remoção de <i>smear layer</i> com abertura de túbulos dentinários.
Isik et al. ⁴³ (2000)	48 amostras obtidas de terceiros molares recém-extraídos foram distribuídas em grupos de acordo com a concentração do TTC-HCl (controle, 10mg/ml, 25mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml, 100mg/ml, 125mg/ml e 150mg/ml) e o tempo de aplicação (1, 3 e 5 minutos)	Os resultados obtidos mostraram que, independentemente do tempo de aplicação e das concentrações utilizadas, o cloridrato de tetraciclina removeu <i>smear layer</i> .
Sampaio ⁸⁵ (2001)	180 amostras provenientes de dentes humanos distribuídas nos grupos de acordo com a concentração de TTC-HCl (soro, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%), forma de aplicação (tópica e fricção com bolas de algodão) e o tempo de aplicação (1, 2 e 3 minutos).	TTC-HCl 10% aplicado por fricção durante 1 ou 2 minutos, apesar da formação de <i>smear layer</i> por dissolução química, foi superior aos demais. Obteve-se resultados semelhantes utilizando-se TTC-HCl 20% aplicado por fricção durante 1 minuto
Mata ⁵⁹ (2002)	estudou a remoção de <i>smear layer</i> utilizando diversas concentrações do TTC-HCl: 50mg/ml, 125mg/ml, 250mg/ml, 500mg/ml e soro como controle.	125mg/ml e 250mg/ml foram as mais eficazes, independente do tempo e do modo de aplicação. A fricção, apesar da formação de <i>smear layer</i> por dissolução química da dentina, foi o método mais eficiente, não tendo o tempo de aplicação qualquer efeito sobre a remoção de <i>smear layer</i>

TTC-HCl – cloridrato de tetraciclina; DP – doença periodontal

3 PROPOSIÇÃO

3 Proposição

O objetivo deste estudo in vitro foi avaliar, por meio de microscopia eletrônica de varredura, a remoção da *smear layer* e a exposição da matriz colágena da dentina produzidas pela aplicação de cloridrato de tetraciclina e determinar a concentração, a forma e o tempo de aplicação mais eficazes.

4 MATERIAL E MÉTODO

4 Material e Método

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, processo 25/2002 (Anexo 1).

Seleção e Obtenção da Amostra

Foram selecionados 225 molares, pré-molares e caninos permanentes humanos recém-extraídos, tendo como único critério de inclusão que o dente apresentasse a junção cimento-esmalte intacta (fundamental para localizar a região de remoção das amostras). Não houve qualquer critério de exclusão. Os dentes foram obtidos na Clínica da Disciplina de Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP.

Após a exodontia, os dentes foram armazenados em um recipiente contendo soro fisiológico a fim de evitar ressecamento dos espécimes.

A área de trabalho escolhida para a realização do estudo foi o terço cervical da raiz por apresentar uma maior quantidade de túbulos dentinários e uma camada mais delgada de cimento radicular, o que facilita a sua remoção. A obtenção da amostra a partir do dente selecionado seguiu o seguinte protocolo:

- realização, com o auxílio de uma fresa cilíndrica diamantada (KG SORENSEN® 2135) em alta rotação sob irrigação constante, de dois sulcos paralelos com profundidade de aproximadamente

0,5mm, o primeiro na junção cimento-esmalte e o segundo 4 mm apical ao primeiro sulco, delimitando assim a área de trabalho (Figuras 1 e 2).



FIGURA 1 – Marcação dos sulcos.

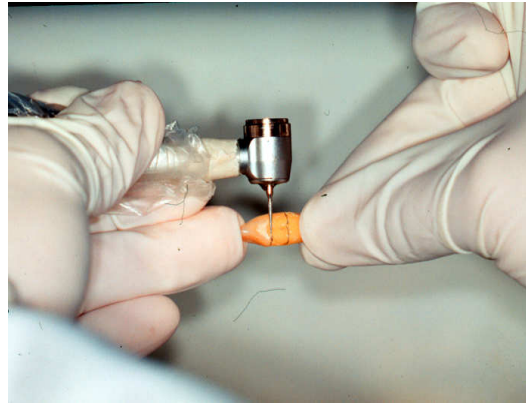


FIGURA 2 – Confeção dos sulcos com fresa.

Esses sulcos foram realizados em duas faces dentais, escolhidas de acordo com o dente, de modo a fornecer amostras mais planas, amplas e sem acidentes anatômicos. Assim, foram selecionadas as faces vestibular e lingual ou as faces mesial e distal de cada dente.

Com a mesma fresa, os dois sulcos foram unidos e a estrutura cementária removida (Figura 3). Com o objetivo de formar a *smear layer*, foram realizados 50 movimentos de raspagem (por dois operadores treinados, tendo cada um deles manipulado 225 das 450 amostras) na área de trabalho de cada uma das faces dentais com curetas de Gracey 5-6 novas (Neumar®) (Figura 4). Sempre que necessário, o instrumento foi afiado com uma pedra de Arkansas plana.



FIGURA 3 – Estrutura cementária removida.

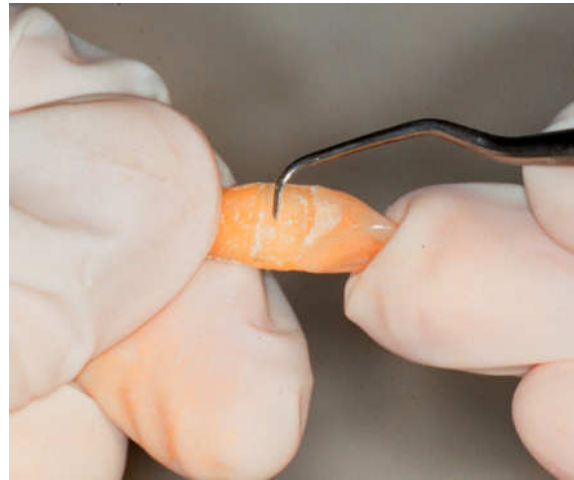


FIGURA 4 – Raspagem radicular.

Após a raspagem, foram realizados os procedimentos de obtenção da amostra. Com um disco diamantado (KG SORENSEN®) em baixa rotação, a coroa foi removida na altura do primeiro sulco (Figura 5). Em seguida, no sentido longitudinal da raiz, foi realizada uma secção até a altura do segundo sulco (Figura 6) e, a partir deste, em sentido transversal (Figura 7), obtendo-se duas amostras medindo aproximadamente 3mmX4mm (Figura 8). Dessa forma, foram produzidas 450 amostras.



FIGURA 5 – Corte transversal da coroa.



FIGURA 6 – Corte longitudinal com disco diamantado.



FIGURA 7 – Corte transversal para obtenção da amostra.



FIGURA 8 – Amostra de dentina.

As amostras foram armazenadas em soro fisiológico para evitar seu ressecamento, o que inviabilizaria a futura avaliação quanto à remoção de *smear layer*.

Tratamento das Amostras

O cloridrato de tetraciclina (TTC-HCl) utilizado no presente estudo foi preparado em farmácia de manipulação (Farmácia Santa

Paula, Araraquara-SP) uma semana antes do início do experimento. O produto, em forma de pó, foi acondicionado em cápsulas com a quantidade exata necessária para atingir a concentração desejada em cada grupo, sendo diluído em 1mL de água destilada, medido com o auxílio de uma pipeta automática (Boeco®) (Figura 9). Essa diluição foi realizada em beakers pequenos (Pyrex®), sendo homogeneizada com uma haste de acrílico imediatamente antes da solução ser aplicada sobre as amostras (Figura 10).



FIGURA 9 – TTC-HCl em cápsulas e 1mL de água.



FIGURA 10 – Agente condicionante preparado.

As 450 amostras obtidas para a realização do estudo foram distribuídas, igualmente e ao acaso, nos seguintes grupos de acordo com o tratamento a que seriam submetidas:

Grupo I – Aplicação de soro fisiológico (Controle).

Grupo II – Aplicação de cloridrato de tetraciclina na concentração de 10mg/ml.

Grupo III – Aplicação de cloridrato de tetraciclina na concentração de 25mg/ml.

Grupo IV – Aplicação de cloridrato de tetraciclina na concentração de 50mg/ml.

Grupo V – Aplicação de cloridrato de tetraciclina na concentração de 75mg/ml.

Grupo VI – Aplicação de cloridrato de tetraciclina na concentração de 100mg/ml.

Grupo VII – Aplicação de cloridrato de tetraciclina na concentração de 125mg/ml.

Grupo VIII – Aplicação de cloridrato de tetraciclina na concentração de 150mg/ml.

Grupo IX – Aplicação de cloridrato de tetraciclina na concentração de 200mg/ml.

Grupo X – Aplicação de cloridrato de tetraciclina na concentração de 250mg/ml.

Os grupos teste e controle foram divididos em subgrupos de acordo com o modo e o tempo de aplicação das soluções.

Formas de aplicação

Cada solução foi aplicada nas amostras de três formas, sempre por um mesmo operador:

Passiva: bolinhas de algodão embebidas nas soluções testadas foram depositadas e pressionadas sobre a amostra com uma pinça clínica

(Duflex®) para escoar o produto (Figura 11). As bolinhas eram trocadas a cada 30 segundos.

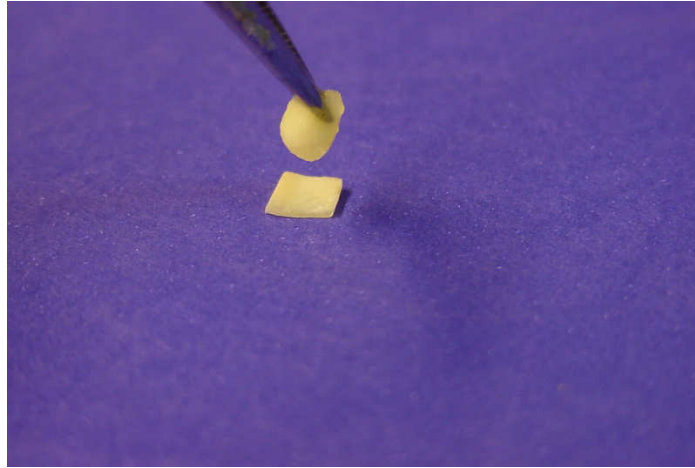


FIGURA 11 – Aplicação tópica.

Fricção vigorosa: bolinhas de algodão embebidas nas soluções testadas e presas a uma pinça clínica foram esfregadas nas amostras (Figura 12). Estas eram mantidas em posição sobre a bancada com o auxílio de outra pinça clínica. As bolinhas de algodão eram trocadas a cada 30 segundos.

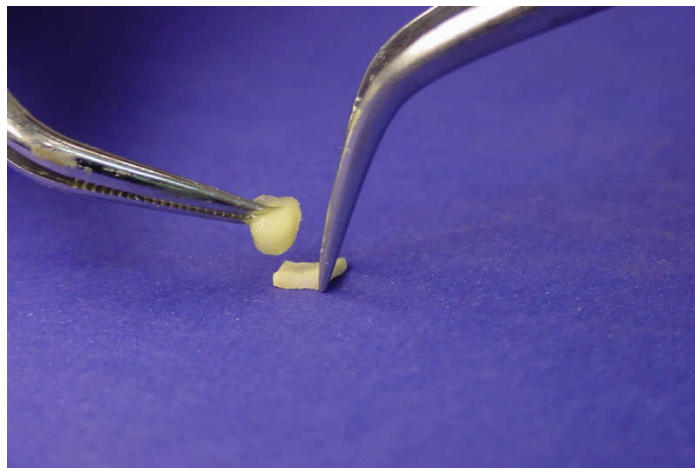


FIGURA 12 – Fricção vigorosa.

Fricção suave: as soluções testadas foram pinceladas (movimentos de vai e vem) sobre as amostras utilizando-se um pincel macio pêlo de Marta (Condor®). As amostras permaneciam presas a uma pinça clínica e apoiadas sobre uma bancada durante o procedimento (Figura 13). O pincel era embebido novamente a cada 30 segundos. Para cada grupo foi utilizado um pincel próprio para evitar a mistura das diversas concentrações.

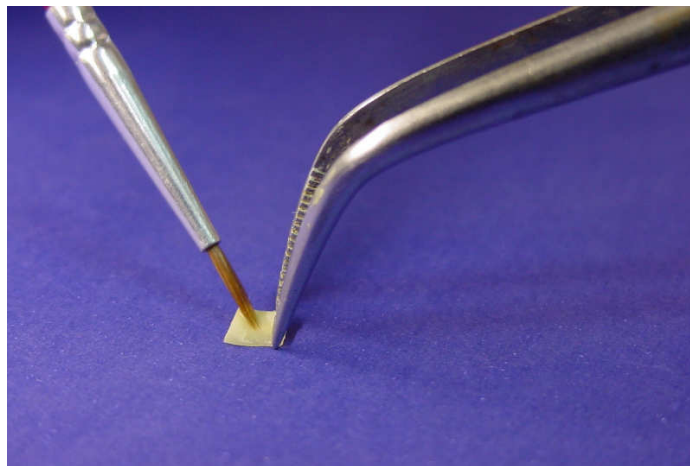


FIGURA 13 – Aplicação com pincel.

Tempo de aplicação

As soluções em suas diversas formas de aplicação foram empregadas durante:

- a) um minuto de aplicação seguida de irrigação com 10 ml de soro fisiológico com uma seringa descartável e sua respectiva agulha;
- b) dois minutos de aplicação seguida de irrigação com 10 ml de soro fisiológico;

- c) três minutos de aplicação seguida de irrigação com 10 ml de soro fisiológico.

Um cronômetro eletrônico foi utilizado para aferir o tempo de aplicação e a necessidade de renovação das substâncias testadas nos dispositivos de aplicação.

Para cada subgrupo de concentração, forma e tempo de aplicação foram utilizadas cinco amostras, totalizando 45 amostras por grupo de concentração e 150 amostras para cada forma e para cada tempo de aplicação conforme o Quadro 1.

Processamento das amostras para análise microscópica

Para avaliar a exposição da matriz colágena dentinária após o tratamento químico das amostras, utilizou-se o método proposto por Tay et al.⁹³ (2000).

As cinco amostras de cada subgrupo foram armazenadas em cassetes codificados (não permitindo que o examinador soubesse a qual grupo as amostras pertenciam) de acordo com a concentração, o tempo e a forma de aplicação. Os cassetes foram forrados e cobertos por papel absorvente, e as amostras ficaram estocadas por 24 horas para secar (Figura 14). Em seguida, os cassetes foram colocados numa placa de Petri (Pyrex®), na qual as amostras foram submetidas à desidratação por meio de imersão em concentrações crescentes de álcool etílico (30°, 50°, 70°, 80°, 95°, 100°), cada uma delas alocada em uma placa de Petri (Figura 15). As amostras permaneceram submersas por uma hora em cada uma das concentrações de álcool. Essa desidratação é necessária para a aplicação do etanol-hexametildisilazane (HMDS) (Sigma-Aldrich Co) (Figura 16), substância fundamental para visualizar a exposição de fibras colágenas.

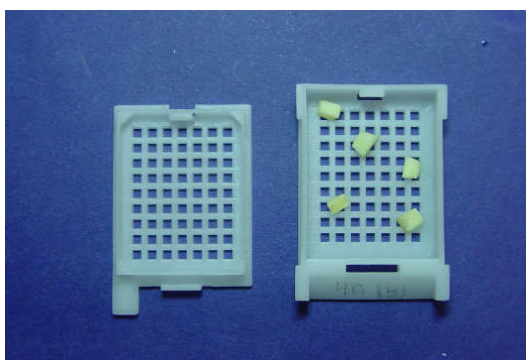


FIGURA 14 – Amostras em cassete codificado.

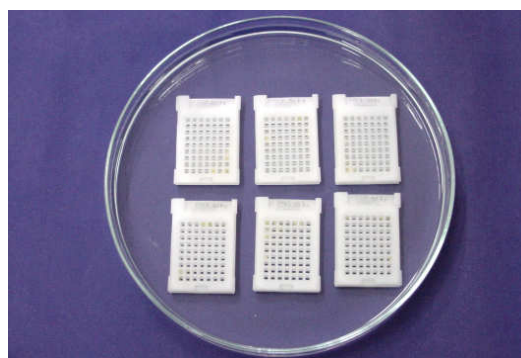


FIGURA 15 – Placa de desidratação seqüencial.



FIGURA 16 – HMDS.

A aplicação do HMDS foi realizada numa placa de acrílico contendo 12 orifícios. A placa foi dividida em duas partes iguais (Figura 17), e, na primeira metade (à esquerda), os seis orifícios codificados de A a F, com cada letra correspondendo a um cassete, continham uma solução de HMDS e álcool absoluto na proporção 1:1. Com a pinça clínica, as amostras foram retiradas dos cassetes e mergulhadas nos orifícios correspondentes, onde permaneceram por 30 minutos.

Decorrido esse tempo, as amostras foram transferidas para os seis orifícios à direita (codificados de A' a F'), que continham HMDS puro, e lá permaneceram por 10 minutos. Toda a manipulação do HMDS foi realizada na capela do laboratório de histologia da Disciplina de Periodontia – Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, pois o HMDS é cancerígeno.



FIGURA 17 – Amostras em placa de acrílico com orifícios.

Finalizada a aplicação do HMDS, as amostras retornaram aos seus respectivos cassetes, e estes foram colocados na placa de Petri tampada e forrada com papel filtro com o intuito de absorver o produto utilizado (Figura 18). Posteriormente as amostras foram coladas com esmalte incolor misturado a grafite em pó em suportes metálicos específicos para avaliação ao microscópio eletrônico de varredura (Figura 19) e mantidas por 48 horas num dessecador a vácuo para desidratação (Figura 20).

A seguir, as amostras foram metalizadas com ouro com 99,99% de pureza por 100 segundos (Figura 21). O aparelho metalizador utilizado foi o BAL-TEC SCD-050. A camada metálica produzida na superfície da amostra apresentava 25nm. Esse passo é necessário para que se consiga a transmissão de elétrons sobre a superfície da amostra. Um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-T330A) ajustado na voltagem de 20Kv foi utilizado para a obtenção das fotomicrografias (filme

NEOPAN SS-120 – Fuji) tiradas do centro da amostras nos aumentos de 1.500X e 3.500X. O técnico operador do microscópio desconhecia os grupos aos quais as amostras pertenciam.

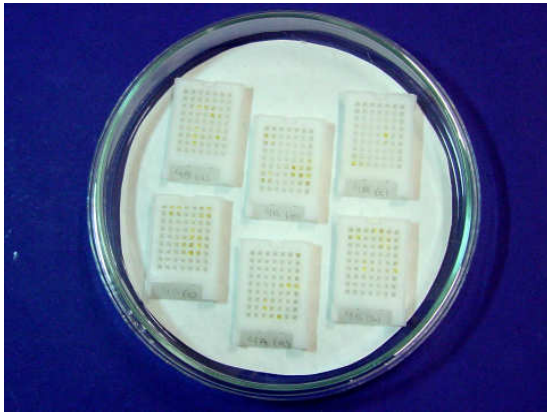


FIGURA 18 – Cassete sobre papel de filtro.



FIGURA 19 – Amostra colada no suporte metálico.



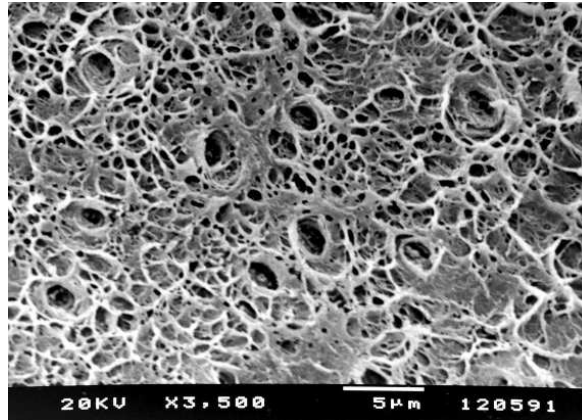
FIGURA 20 – Dessecador a vácuo.



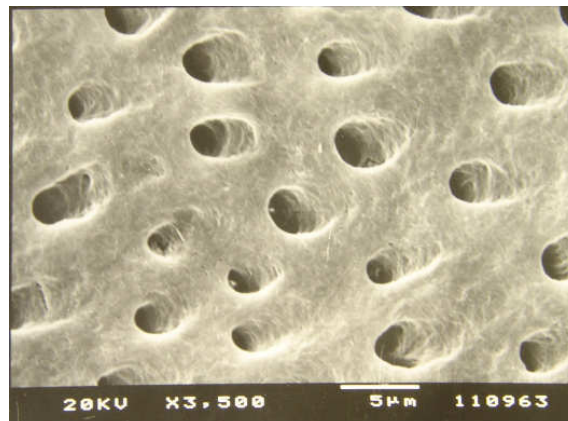
FIGURA 21 – Amostra metalizada.

As fotomicrografias foram enviadas a um examinador treinado e calibrado que desconhecia a que grupo cada fotomicrografia pertencia, o qual realizou três avaliações de cada imagem, com um intervalo de 15 dias entre cada avaliação. Para determinar a magnitude de remoção de *smear layer* em cada fotomicrografia foi utilizado o índice de remoção de *smear layer* proposto por Sampaio⁸³ (1999) modificado para este estudo, que consiste de oito escores que serão apresentados a seguir. O escore que se repetiu em duas ou em três avaliações, foi o escore atribuído à amostra (Anexo 2). Nos casos em que ocorreram três leituras diferentes, estas eram repetidas até que houvesse concordância entre, pelo menos, duas delas. Para avaliar a reprodutibilidade intra-examinador na aplicação do índice de remoção de *smear layer*, foi elaborada uma tabela de contingência com os escores atribuídos às fotomicrografias e então foi aplicado o teste kappa ponderado¹⁹, sendo obtido o coeficiente 0,89 (Anexo 3). A tabela de contingência foi construída considerando como “primeira leitura” o escore mais prevalente nas três leituras realizadas, sendo a “segunda leitura” representada pelo escore menos prevalente. Quando o mesmo escore foi atribuído à fotomicrografia nas três leituras, foi considerado que houve reprodutibilidade exata na primeira e na segunda leitura.

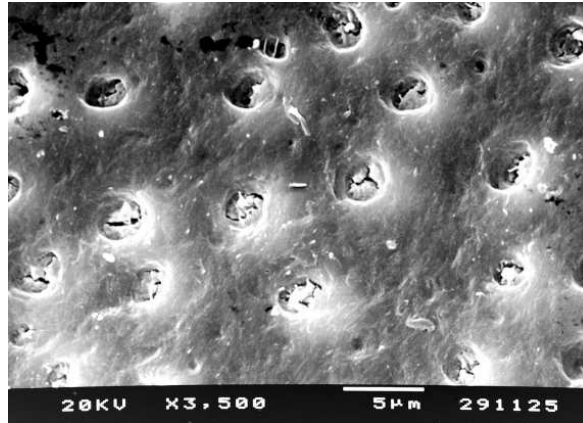
Índice de remoção de *smear layer*



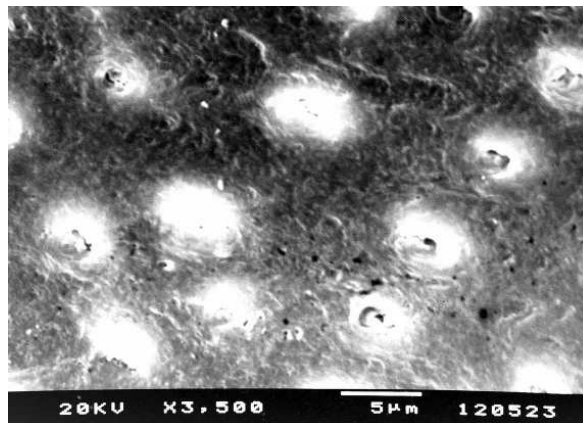
Escore 1: Superfície radicular sem *smear layer*, com abertura total dos túbulos dentinários, sem indícios de *smear layer* na abertura dos túbulos e com exposição de fibras colágenas de dentina.



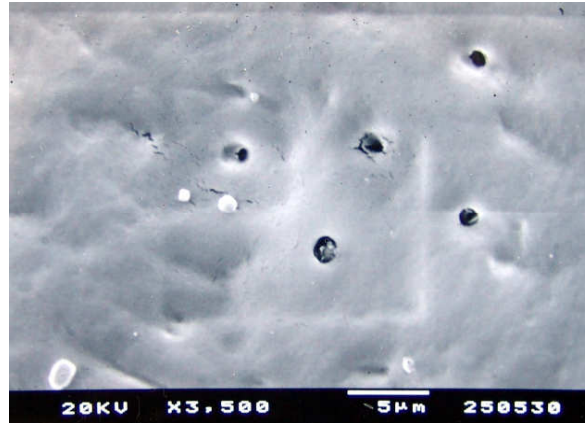
Escore 2: Superfície radicular sem *smear layer* com abertura total dos túbulos dentinários, sem indícios de *smear layer* na abertura dos túbulos.



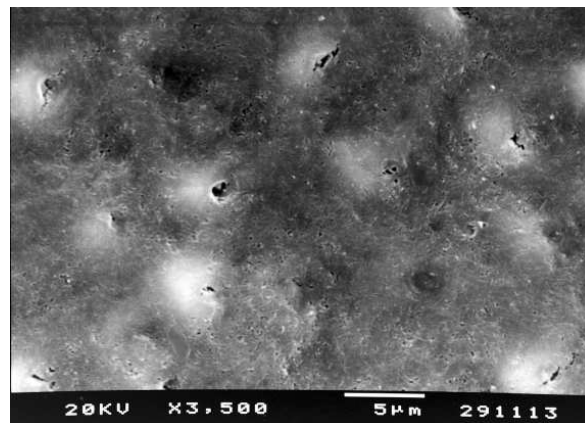
Escore 3: Superfície radicular sem *smear layer* com abertura total dos túbulos dentinários, e com indícios de *smear layer* na abertura dos túbulos.



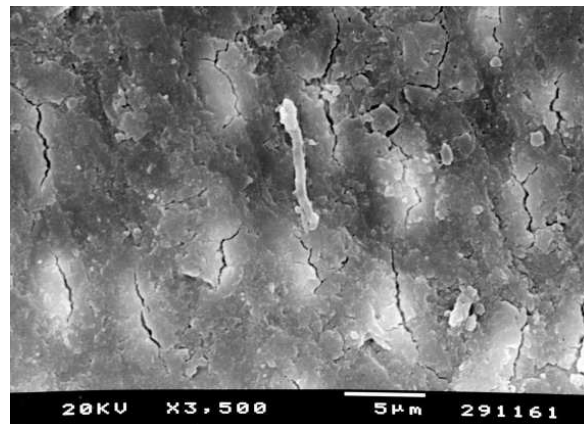
Escore 4: Superfície radicular sem *smear layer* com abertura parcial dos túbulos dentinários.



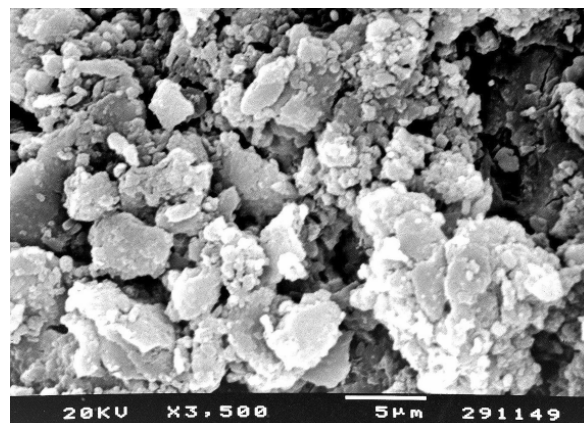
Escore 5: Superfície radicular coberta por *smear layer* com aspecto uniforme, formada por dissolução química apresentando abertura ou não de túbulos dentinários.



Escore 6: Superfície radicular coberta por *smear layer* com aspecto uniforme, apresentando indícios de abertura dos túbulos dentinários.



Escore 7: Superfície radicular coberta por *smear layer* com aspecto uniforme, sem indícios de abertura dos túbulos dentinários.



Escore 8: Superfície radicular coberta por *smear layer* com aspecto irregular e presença de estrias e/ou depósitos esparsos.

Os dados obtidos com a leitura das fotomicrografias foram tabulados e submetidos à análise estatística.

Análise Estatística

A variável ordinal “índice de remoção de *smear layer*” foi avaliada por meio de análise de variância não paramétrica (teste de Kruskal-Wallis) em virtude da distribuição não-normal dos dados. Os

testes foram aplicados comparando os grupos dentro de cada uma das três variáveis separadamente: concentração (Grupo Controle, TTC-HCl 10mg/mL, TTC-HCl 25mg/mL, TTC-HCl 50mg/mL, TTC-HCl 75mg/mL, TTC-HCl 100mg/mL, TTC-HCl 125mg/mL, TTC-HCl 150mg/mL, TTC-HCl 200mg/mL e TTC-HCl 250mg/mL), tempo de aplicação (1, 2 e 3 minutos) e modo de aplicação (passiva, fricção vigorosa e fricção suave).

Foi adotado o nível de significância de 0,05. Assim, sendo $p > 0,05$, a hipótese de nulidade (H_0), pela qual todos os tratamentos apresentariam igual capacidade de remoção de *smear layer*, foi aceita. Sendo $p \leq 0,05$, a H_0 foi rejeitada. Neste caso, a comparação entre os postos médios das amostras foi efetuada a partir do teste de Dunn a fim de se detectar entre quais grupos a diferença existiu. O programa estatístico utilizado para a execução dos testes foi o Biostat 3.0 (Sociedade Civil Mamirauá/MCT-CNPq).

5 RESULTADO

5 Resultado

A distribuição dos escores das diferentes concentrações de cloridrato de tetraciclina em ordem decrescente de benefício (1 a 8) mostrou que as concentrações com maior capacidade de expor a matriz colágena da dentina, ou seja, as que produziram maior número de escores 1 foram as de 50mg/ml e 75mg/ml (12 amostras – 26,7% das amostras desses grupos), seguidas pelas concentrações 100mg/ml e 200mg/ml (10 amostras – 22,2% das amostras desses grupos), 250mg/ml (9 amostras – 20% das amostras), 125mg/ml (8 amostras – 17,8% das amostras), 150mg/ml (7 amostras – 15,5% das amostras), 25mg/ml (5 amostras – 11,1% das amostras) e 10mg/ml (3 amostras – 6,7% das amostras). O grupo controle não apresentou escore 1 (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição da freqüência dos escores referentes aos diferentes graus de remoção de *smear layer* conforme a concentração, a forma e o tempo de aplicação do agente condicionante.

	Controle	10	25	50	75	100	125	150	200	250
1.	4F3	1F2	1P3	1F1	1P2	1F3	1F1	1F1	1P1	1N1
2.	4F3	1F3	1F3	1F1	1F1	1N1	1F2	1F1	1F1	1N1
3.	6F1	1F3	1N2	1F2	1F1	1N2	1F2	1F2	1F2	1N2
4.	6F1	2F3	1N2	1F2	1F1	1N2	1F2	1F3	1F3	1N2
5.	6F1	3F2	1N2	1F2	1F2	1N2	1N2	1N3	1N2	1N2
6.	6F2	3F2	2F1	1F2	1F2	1N3	1N3	1N3	1N2	1N3
7.	6F2	4P3	2F2	1F3	1F2	1N3	1N3	1N3	1N2	1N3
8.	6F3	4F1	2F2	1F3	1F2	1N3	1N3	2F2	1N3	1N3
9.	6F3	4F1	3F1	1F3	1N2	1N3	2F1	2N1	1N3	1N3
10.	7P1	4F1	3F1	1N2	1N2	1N3	2F2	2N1	1N3	2F1
11.	7P2	4F2	3F1	1N2	1N2	2F1	2F3	2N2	3P2	2F1
12.	7P2	4F2	3F2	1N2	1N3	2F1	2N1	2N2	3F1	2N2
13.	7P2	4F3	3F2	2F2	2F3	3F1	2N2	3P2	3F1	3P3
14.	7P3	4F3	3F3	2F3	2F3	3F2	3P3	3P3	4P2	3N1
15.	7P3	4N1	3F3	2F3	2N2	3N1	3F1	3F1	4P2	4N1
16.	7F1	4N3	3F3	2N2	2N2	3N2	3N1	3F2	4P3	4N1
17.	7F1	6P1	3N3	2N3	2N3	4P1	3N2	3N2	4P3	5F1
18.	7F2	6P3	3N3	3F1	2N3	4P1	4P2	3N2	4P3	5F1
19.	7F2	6F1	4P3	3F1	2N3	4P2	4P2	3N3	4F2	5F1
20.	7F2	6F1	4F2	3N3	3F1	4P2	4P3	3N3	4F2	5F2
21.	7F3	6N1	4F3	4P2	3F1	5F1	4P3	4P1	5F1	5F2
22.	7N1	6N1	4N2	4P3	3F3	5F1	4P3	4P2	5F1	5F2
23.	7N1	6N2	6P3	4F1	3F3	5F2	4N1	4P3	5F2	5F2
24.	7N1	6N2	6F1	4N1	3N1	5F2	4N1	4P3	5F2	5F2
25.	7N2	6N2	6N1	4N1	4P3	5F2	4N2	4N1	5F3	5F3
26.	7N2	6N3	6N1	4N2	4P3	5F2	5F1	5F1	5F3	5F3
27.	7N2	6N3	6N2	4N3	4P3	5F3	5F1	5F1	5F3	5F3
28.	7N2	6N3	6N3	6P1	4F2	5F3	5F2	5F2	5F3	5F3
29.	7N3	7P1	6N3	6P1	4F3	5F3	5F3	5F2	5N1	5F3
30.	7N3	7P1	7P1	6P1	4N1	5F3	5F3	5F3	5N1	5N2
31.	7N3	7P2	7P1	6P1	4N1	6P1	5F3	5F3	5N1	5N3
32.	7N3	7P2	7P2	6P2	4N1	6P2	5F3	5F3	5N1	6P2
33.	7N3	7P2	7P2	6P2	4N1	6P3	5N1	5F3	5N1	6P2
34.	8P1	7P2	7P3	6P2	4N3	6P3	5N2	6P1	5N2	6P3
35.	8P1	7P2	7P3	6P2	6P1	6P3	5N3	6P1	5N2	6P3
36.	8P1	7P3	7N1	6P3	6P1	6N1	5N3	6P1	5N3	7P1
37.	8P1	7P3	7N1	6P3	6P2	6N1	6P1	6P2	6N3	7P2
38.	8P2	7N1	7N3	6N1	6P2	6N2	6P2	6P2	7P1	7P3
39.	8P2	7N1	8P1	6N1	6P3	8N1	6P2	6P3	7P1	8P1
40.	8P3	7N2	8P1	6N3	7P1	8P3	7P3	6N1	7P1	8P1
41.	8P3	7N2	8P1	6N3	7P1	8P3	7P1	6N1	7P2	8P1
42.	8P3	7N3	8P2	7N1	7P1	8P2	7P1	6N2	7P3	8P1
43.	8N1	8P1	8P2	7P3	7P2	8P2	8P2	7P1	8P1	8P2
44.	8N1	8P1	8P2	7P3	7P3	8P1	8P1	7P2	8P2	8P2
45.	8N2	8P2	8N1	8P1	8P2	8P1	8P1	8P3	8P3	8P3

escore 1
escore 2
escore 3
escore 4
escore 5
escore 6
escore 7
escore 8

Legenda: **escore** (1-8), **forma de aplicação** (passiva (P), fricção (F), pincel (N)) e **tempo de aplicação**(1-3)

Com relação às formas de aplicação, a mais prevalente entre as amostras com escore 1 foi a aplicação por pincel, seguida pelas fricção e aplicação passiva (Tabela 2).

Tabela 2 – Distribuição da frequência dos escores referentes aos diferentes graus de remoção de *smear layer* conforme a forma de aplicação do agente condicionante

Forma aplicação	Passiva n(%)	Pincel n(%)	Fricção n(%)
Escore 1	3 (2,0)	41 (27,3)	32 (21,3)
Escore 2	0 (0)	14 (9,3)	17 (11,3)
Escore 3	5 (3,3)	13 (8,6)	23 (15,3)
Escore 4	25 (16,7)	18 (12,0)	16 (10,7)
Escore 5	0 (0)	14 (9,3)	46 (30,7)
Escore 6	36 (24,0)	24 (16,0)	10 (6,7)
Escore 7	41 (27,3)	21 (14,0)	6 (4,0)
Escore 8	40 (26,7)	5 (3,3)	0 (0)
TOTAL	150 (100)	150 (100)	150 (100)
Kruskal-Wallis*	A	B	B
p=0.00001			

Letras iguais* – ausência de diferença estatística

Com relação aos tempos de aplicação, o mais prevalente entre as amostras com escore 1 foi o tempo de 2 minutos, seguido por 3 minutos e 1 minuto (Tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição da freqüência dos escores referentes aos diferentes graus de remoção de *smear layer* conforme o tempo de aplicação do agente condicionante

Tempo aplicação	1' n(%)	2' n(%)	3' n(%)
Escore 1	13 (8,7)	34 (22,7)	29 (19,3)
Escore 2	9 (6,0)	12 (8,0)	10 (6,7)
Escore 3	16 (10,7)	12 (8,0)	13 (8,7)
Escore 4	19 (12,7)	17 (11,3)	23 (15,3)
Escore 5	17 (11,3)	18 (12,0)	25 (16,7)
Escore 6	38 (25,3)	21 (14,0)	21 (14,0)
Escore 7	25 (16,7)	23 (15,3)	20 (13,3)
Escore 8	13 (8,7)	13 (8,7)	9 (6,0)
TOTAL	150 (100)	150 (100)	150 (100)
Kruskal-Wallis*	A	B	B
P =0.0018			

Letras iguais* – ausência de diferença estatística

A concentração de 75mg/ml é a que produziu o maior número de escores entre 1 e 4 (34 amostras – 75,5% das amostras desse grupo), refletindo sua maior capacidade de remover a *smear layer* e expor fibras colágenas, seguida pelas concentrações de 50mg/ml (27 amostras – 60,0% das amostras), de 125mg/ml e 150mg/ml (25 amostras – 55,5% das amostras), de 25mg/ml (22 amostras – 48,9% das amostras), de 100mg/ml e 200mg/ml (20 amostras – 44,4% das amostras), de 10mg/ml

e 250mg/ml (16 amostras– 35,5% das amostras) e pelo soro fisiológico (duas amostras – 4,4% das amostras) (Tabela 1).

Com relação às formas de aplicação, a mais prevalente entre as amostras com escores de 1 a 4 foi a fricção (58,6% das amostras), seguida pela aplicação com pincel (57,2% das amostras) e aplicação passiva (22% das amostras) (Tabela 2).

Com relação aos tempos de aplicação, os mais prevalentes entre as amostras com escores entre 1 e 4 foram os tempos de 2 e 3 minutos (50% das amostras) seguidos por 1 minuto (38,1% das amostras) (Tabela 3).

Das 450 amostras deste estudo, 60 apresentaram superfícies radiculares cobertas por *smear layer* formada por dissolução química da estrutura dental (escore 5) (Tabela 4). Em ordem decrescente, a concentração de 200 mg/ml produziu 16 amostras com escore 5, seguida pelas de 250 mg/ml, 125 mg/ml, 100 mg/ml e 150 mg/ml. Tanto as concentrações abaixo de 100mg/ml como o soro fisiológico (grupo controle) não produziram escore 5.

A forma de aplicação que mais produziu amostras com escores 5 foi a fricção, seguida pelo pincel. A forma passiva não produziu escore 5 (Tabela 4).

Com relação ao tempo de aplicação, o que mais produziu escore 5 foi 3 minutos, seguido por 2 minutos e 1 minuto (Tabela 4).

Tabela 4 – Distribuição da frequência do escore 5 nas concentrações, formas e tempos de aplicação de cloridrato de tetraciclina

Concentrações					
	100	125	150	200	250
Frequência n(%)	10 (16,7)	11 (18,3)	8 (13,3)	16 (26,7)	15 (25)
Forma de aplicação					
	Passivo	Pincel	Fricção		
Frequência n(%)	0 (0)	14 (23,3)	46 (76,7)		
Tempo de aplicação					
	1 minuto	2 minutos	3 minutos		
Frequência n(%)	11 (18,3)	14 (23,3)	35 (58,4)		

Todos as concentrações apresentaram amostras com *smear layer* (escores 7 e 8), 113 amostras no total. O grupo do soro fisiológico apresentou 36 amostras com escores 7 e 8, seguido pelos das concentrações 10mg/ml, 25mg/ml, 250mg/ml, 200mg/ml, 100mg/ml, 125mg/ml, 75mg/ml, 50mg/ml e 150mg/ml (Tabela 5).

Com relação às formas de aplicação, a mais prevalente entre as amostras com escores 7 e 8 foi a passiva, seguida pela aplicação com pincel e pela aplicação por fricção (Tabela 5).

Com relação aos tempos de aplicação, os mais prevalentes entre as amostras com escores 7 e 8 foi o tempo de 1 minuto, seguido por 2 minutos e 3 minutos (Tabelas 5).

Tabela 5 – Distribuição da frequência dos escores 7 e 8 nas concentrações, formas e tempos de aplicação de cloridrato de tetraciclina

Concentrações										
	Ctrl	10	25	50	75	100	125	150	200	250
Freq n(%)	36 (31,9)	17 (15)	16 (14,2)	4 (3,5)	6 (5,3)	7 (6,2)	6 (5,3)	3 (2,7)	8 (7,1)	10 (8,8)

Forma de aplicação			
	Passivo	Pincel	Fricção
Frequência n(%)	81 (71,7)	26 (23,0)	6 (5,3)

Tempo de aplicação			
	1 minuto	2 minutos	3 minutos
Frequência n(%)	48 (42,5)	36 (31,8)	29 (25,7)

Ctrl – controle

A análise dos parâmetros forma e tempo de aplicação dentro das duas concentrações mais eficazes, ou seja, aquelas que produziram maior frequência de escores 1 e 2, indica maior frequência nas formas de aplicação por pincel e fricção e uma tendência de superioridade da aplicação por fricção na concentração de 50mg/ml. Com relação ao tempo de aplicação, observa-se superioridade do grupo de 2 minutos de aplicação, seguido por 3 e 1 minutos, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6 – Distribuição da frequência dos escores 1 ou 2 dentro das concentrações de 50mg/ml e 75mg/ml

Concentração					
50mg/ml n(%)			75mg/ml n(%)		
17 (100)			19 (100)		
Forma de aplicação					
50mg/ml n(%)		75mg/ml n(%)		75mg/ml n(%)	
Passivo	Pincel	Fricção	Passivo	Pincel	Fricção
0 (0)	5 (29,4)	12 (70,6)	1 (5,2)	9 (47,4)	9 (47,4)
Tempo de aplicação					
50mg/ml n(%)		75mg/ml n(%)		75mg/ml n(%)	
1 minuto	2 minutos	3 minutos	1 minuto	2 minutos	3 minutos
2 (11,8)	9 (52,9)	6 (35,3)	3 (15,8)	19 (52,6)	6 (31,6)

6 DISCUSSÃO

6 Discussão

Segundo a literatura, a desmineralização de superfícies radiculares destituídas de sua inserção conjuntiva tem o potencial de promover a regeneração dos tecidos periodontais. Isso ocorreria devido à descontaminação da superfície radicular, à remoção da *smear layer* e à exposição da matriz colágena da dentina e de outras proteínas da matriz dentinária que teriam o potencial de influenciar os eventos de cicatrização periodontal.

Baseado nessa premissa, é preciso determinar quais são os agentes condicionantes (biomodificadores) mais eficientes. Os agentes mais estudados são o ácido cítrico, o cloridrato de tetraciclina e o EDTA. Estudos in vivo demonstraram a capacidade do ácido cítrico em favorecer a estabilização do coágulo sanguíneo sobre a superfície dental^{10,72}, e a ligação entre o colágeno da matriz orgânica dental e o do tecido conjuntivo^{78,86,87} fenômenos estes considerados importantes para a regeneração da inserção conjuntiva⁸. Recentemente, Ruggeri et al.⁸² (2006) demonstraram que, apesar da sua natureza ácida, o ácido cítrico foi capaz de expor a matriz colágena da dentina mantendo a sua integridade estrutural (comprovada por imunohistoquímica para colágeno tipo I e sulfato de condroitina), apresentando resultados superiores na exposição da matriz orgânica dental quando comparado ao condicionamento realizado com EDTA (que foi menos eficiente em remover a matriz inorgânica da estrutura dental). Embora o EDTA possua

a capacidade de remover a *smear layer* e expor a matriz colágena da dentina atuando em pH neutro, o que, em teoria, o torna mais biocompatível do que o ácido cítrico e o cloridrato de tetraciclina, existem evidências preliminares indicando que esse agente não favorece a adesão do coágulo sanguíneo à superfície radicular pelo fato de inibir a coagulação sanguínea⁵². Isso foi corroborado pelo estudo clínico de Blomlof et al.¹⁶ (2000), o qual não observou efeito benéfico do condicionamento com EDTA sobre os parâmetros de ganho de inserção e redução de profundidade de sondagem.

O cloridrato de tetraciclina possui diversas características desejáveis a um agente de biomodificação radicular, tais como a capacidade de remover a *smear layer*^{45,56,59,84}, de expor a matriz colágena da estrutura dental^{17,35,44,51}, de produzir superfícies com afinidade por fibronectina⁹⁴, de adsorver à superfície dental e de ser liberada posteriormente (substantividade)⁷, de inibir enzimas colagenolíticas associadas à destruição dos tecidos periodontais (MMPs)^{1,100,101}, de inibir a produção de óxido nítrico sintetase^{25,61} e de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)⁸⁸, de promover a estabilização do coágulo sanguíneo¹⁰ e apresentar ação antimicrobiana⁷⁴ contra periodontopatógenos^{48,91}. A ação antimicrobiana é um fator relevante, pois a doença periodontal é uma condição crônica de natureza infecciosa e a carga bacteriana de espécies do complexo vermelho e *Tannerella forsythensis* em sítios periodontais com defeitos ósseos verticais apresenta relação inversamente

proporcional ao ganho de inserção após tratamento regenerativo pela técnica da regeneração tecidual guiada³⁸. Em contrapartida, o cloridrato de tetraciclina apresenta pH ácido, existindo uma relação inversamente proporcional entre o pH e a concentração da solução de cloridrato de tetraciclina. Isto é significativo, pois pode interferir na viabilidade celular¹² e nos eventos iniciais do processo de cicatrização periodontal^{4,100}.

Entretanto, a tetraciclina é uma das substâncias mais utilizadas no tratamento de sítios periodontais¹⁷, sendo muitas vezes aplicada diretamente nesses locais como coadjuvante no tratamento da doença periodontal^{28,45,53,80}, no tratamento de manutenção⁹⁵ e em procedimentos regenerativos^{37,39}, produzindo resultados equivalentes ou estatisticamente superiores aos obtidos pela terapia convencional. É preciso enfatizar que, durante a aplicação do cloridrato de tetraciclina, é importante evitar o contato da substância com os tecidos moles⁶⁴ e ter o cuidado de remover resíduos de cloridrato de tetraciclina das superfícies dentais após o condicionamento por meio de uma lavagem cuidadosa da superfície radicular²² devido ao seu potencial citotóxico.

Diversos estudos *in vivo*^{4,10,17,22,64} e *in vitro*^{21,94,96} verificaram as respostas biológicas induzidas pela biomodificação com o cloridrato de tetraciclina, sendo os resultados controversos. Terranova et al.⁹⁴ (1986) observaram maior adesão de laminina (proteína ligada à adesão de queratinócitos) nas amostras que não receberam condicionamento com cloridrato de tetraciclina. Já a adesão máxima de fibronectina (proteína

ligada à adesão de fibroblastos) foi obtida a partir do condicionamento utilizando a concentração de 100mg/ml. O ensaio de cultura de células corroborou esses achados, uma vez que as amostras não condicionadas apresentaram adesão epitelial quatro vezes maior do que a fibroblástica e as amostras condicionadas com cloridrato de tetraciclina e tratadas com fibronectina apresentaram adesão de fibroblastos quatro vezes maior do que as amostras que não receberam condicionamento. Entretanto, os autores demonstraram que, incubando as amostras de dentina tratadas com cloridrato de tetraciclina e fibronectina em saliva, foi suprimida a capacidade da fibronectina de mediar a adesão dos fibroblastos. Isso poderia ser uma das razões pelas quais os resultados clínicos da biomodificação são limitados.

O estudo de Chandra et al.²¹ (2006) verificou a adesão e a morfologia de células V79 (fibroblasto pulmonar de hamster) e de fibroblastos de ligamento periodontal humano sobre superfícies dentinárias oriundas de dentes com periodontite. As amostras condicionadas com EDTA e ácido cítrico foram as que apresentaram resultados mais favoráveis com relação à morfologia da superfície radicular e das células. O grupo tratado com cloridrato de tetraciclina apresentou amostras com remanescentes de *smear layer* sem exposição de fibras colágenas e com pobre adesão de células. Uma possível explicação para o resultado apresentado pelo grupo tratado com cloridrato de tetraciclina pode ser a baixa concentração utilizada (TTC-HCL10%),

que não foi capaz de remover a *smear layer* (e toxinas) e de expor a matriz colágena dental.

Com relação aos estudos *in vivo*, aspectos relevantes como a formação de coágulo sanguíneo sobre superfícies radiculares afetadas por periodontite foram avaliados por Bal et al.¹⁰ (1990) que testaram, em humanos, a biomodificação com ácido cítrico 1% e o cloridrato de tetraciclina na concentração de 50 mg/ml aplicados por 3 minutos. A análise descritiva de fotomicrografias obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura mostrou que a formação do coágulo apresentava-se mais avançada no grupo tratado com cloridrato de tetraciclina do que no grupo tratado com ácido cítrico. Esse dado é relevante, pois a ligação precoce do coágulo sanguíneo com a superfície radicular poderia impedir ou reduzir a migração apical do epitélio juncional.

Outros estudos foram desenvolvidos para avaliar o efeito da biomodificação com cloridrato de tetraciclina na cicatrização de sítios com lesões periodontais e de sítios que receberam tratamento para cobertura de recessões gengivais. O estudo não controlado de Claffey et al.²² (1987) demonstrou, em cães, resultados positivos com a aplicação do cloridrato de tetraciclina 1% em sítios com doença periodontal, com média de ganho de inserção conjuntiva de 5,9mm. Entretanto, no estudo controlado realizado por Nagata et al.⁶⁴ (2005), no qual testaram o cloridrato de tetraciclina 10% em macacos, não foi observado efeito benéfico estatisticamente significativo da biomodificação com cloridrato de

tetraciclina sobre a cicatrização dos tecidos periodontais. Esse resultado poderia ser explicado pela baixa concentração utilizada, que pode ter sido incapaz de produzir a biomodificação.

Em humanos, a biomodificação foi testada como coadjuvante no tratamento de sítios com perda de inserção periodontal em dentes com indicação de extração (os quais foram analisados histologicamente)⁴ e em procedimentos de cobertura radicular¹⁸. Os autores não observaram efeitos significantes (tanto do ponto de vista clínico, como do estatístico) com o uso do cloridrato de tetraciclina na biomodificação radicular.

Embora os estudos in vivo, em geral, indiquem que a biomodificação com o cloridrato de tetraciclina não traz benefícios à cicatrização dos tecidos periodontais, isso pode ser atribuído à falta de parâmetros bem estabelecidos para a utilização desse agente condicionante. Esse fato pode ser observado pela falta de uniformidade nos parâmetros utilizados nos estudos em geral. Portanto, determinar in vitro os parâmetros mais eficientes para a aplicação do cloridrato de tetraciclina é importante e deve preceder a aplicação desse agente nos estudos in vivo. Outro fator importante que deve ser levado em consideração é o tempo de exposição da raiz dental ao meio bucal, o que produz contaminação^{2,33} e hipermineralização^{24,104} da superfície radicular, sendo observado que esses fatores podem influenciar a biomodificação,

dificultando a descontaminação, a desmineralização e a exposição de fibras colágenas dentinárias ou cementárias.

Os resultados do presente estudo demonstraram que o procedimento de raspagem e de alisamento radicular realizado nas amostras foi capaz de produzir a *smear layer* e que o cloridrato de tetraciclina foi eficaz na sua remoção e na exposição da matriz de colágeno dentinária, tendo sido as concentrações de 50mg/ml e 75mg/ml as mais efetivas, pois apresentaram as maiores freqüências de escores 1 e 2, freqüências reduzidas de escores 7 e 8 e ausência de escore 5 (Tabela 1). Muito embora o grupo de 150mg/ml tenha produzido a menor freqüência de escores 7 e 8 entre todas as concentrações de cloridrato de tetraciclina (o que seria, teoricamente, relevante), essa menor freqüência não foi expressiva. Mais expressivas foram a maior freqüência de escores intermediários (escores de 3 a 6) e a baixa freqüência de escores 1 e 2 que o grupo de 150mg/ml apresentou.

A literatura demonstra que a concentração da solução é um fator crítico para a eficácia do cloridrato de tetraciclina^{43,50,59}, pois concentrações baixas apresentaram baixa eficiência na remoção da *smear layer* e na promoção da desmineralização dentinária^{35,43}, enquanto concentrações que variaram de 10mg/ml a 250mg/ml promoveram, em diferentes graus, a remoção de *smear layer*^{43,50,59}. Essas afirmações estão de acordo com os resultados do nosso estudo.

Quanto à forma de aplicação, o uso do pincel e a fricção apresentaram resultados superiores quando comparados à forma passiva, havendo diferença estatisticamente significativa ($p=0,00001$). Houve uma tendência geral de a aplicação com pincel ser superior à aplicação por fricção, pois produziu frequência 6% maior de amostras com escore 1 (Tabela 2). Entretanto, a maior frequência de escore 1 no grupo de aplicação com pincel concentrou-se nos grupos de concentrações altas de cloridrato de tetraciclina (a partir de 100mg/ml). Nas concentrações que apresentaram maior frequência de escores 1 e 2 (50mg/ml e 75mg/ml), a maioria das amostras havia sido tratada pela forma de fricção sugerindo que esta é a melhor forma de aplicação do cloridrato de tetraciclina nessas concentrações. Esta observação é corroborada pelo fato de que as amostras tratadas por fricção apresentaram menor frequência de escores 6, 7 e 8 (Tabela 2).

Embora Bergeholtz, Babay¹¹ (1998) tenham demonstrado que a forma de aplicação pode comprometer a integridade da matriz colágena da dentina, inferindo que a ação mecânica da fricção poderia romper as fibras colágenas, esse fenômeno não foi observado no presente estudo e nem nos estudos de Isik et al.⁴⁴ (1997) e de Ruggeri et al.⁸² (2007). Entretanto, a forma de aplicação por fricção apresentou frequência três vezes maior de escore 5 do que a aplicação com pincel quando utilizadas soluções com concentrações de cloridrato de tetraciclina a partir de 100mg/ml. Isso sugere que a combinação de

concentrações iguais ou superiores a 100mg/ml com a aplicação por fricção deve ser evitada.

Com relação ao tempo de aplicação, os tempos de 2 e 3 minutos foram superiores ao de 1 minuto, sendo a diferença estatisticamente significativa ($p=0,0018$). Houve uma tendência da aplicação por 2 minutos ser superior à aplicação por 3 minutos, pois produziu maior freqüência de amostras com escores 1 e 2 (o grupo de 2 minutos apresentou freqüência 3% maior de escore 1 e 1,4% maior de escore 2) (Tabela 3). Houve diferença muito discreta na freqüência de escores 7 e 8 entre os três tempos de aplicação, embora o grupo de 3 minutos tenha apresentado menor tendência a apresentar esses escores. O contrário ocorreu com a freqüência de escore 5, tendo o grupo 3 minutos apresentado a maior ocorrência. Esses resultados sugerem que a aplicação por 2 minutos é a mais eficaz, seguida pela dos tempos de 3 minutos e 1 minuto.

Labahn et al.⁵⁰ (1992) aplicaram cloridrato de tetraciclina na concentração de 100mg/ml por 30 segundos, 1, 2 e 4 minutos pela aplicação passiva e por fricção e verificaram que o aumento do diâmetro dos túbulos dentinários foi dependente do tempo de aplicação e independente da forma de aplicação. Esse achado está em desacordo com os resultados do nosso estudo. Esses autores observaram tendência de maior abertura de túbulos dentinários no grupo de aplicação por fricção. No entanto, é importante enfatizar que o número reduzido de

amostras (4 amostras para cada tempo de aplicação, perfazendo um total de 16 amostras) pode ter comprometido o poder estatístico do estudo em detectar a diferença entre as formas de aplicação.

Isik et al.⁴⁴ (1997) inferiram que a forma de aplicação é mais importante do que o tempo, e por isso, padronizaram o tempo de aplicação em 5 minutos. Esses autores mostraram que a aplicação de cloridrato de tetraciclina com pincel promoveu maior abertura dos túbulos dentinários e que a fricção promoveu maior exposição da matriz de colágeno dentinária mantendo a sua integridade. No nosso estudo, não houve diferença estatística entre o grau de remoção de *smear layer* promovida pela aplicação com pincel e por fricção; entretanto, observamos maior frequência de exposição de matriz de colágeno (escore 1) no grupo de aplicação com pincel (Tabela 2). Essa diferença entre os resultados dos dois estudos pode ser atribuída a diferenças de metodologia, pois Isik et al.⁴⁴ (1997) utilizaram terceiros molares impactados, que supostamente apresentam menor grau de mineralização da superfície dental, e não realizaram a raspagem e alisamento radicular nas amostras, o que pode ter influenciado a *smear layer* formada. Os autores utilizaram, ainda, apenas uma concentração de tetraciclina (solução saturada 0,5% g/ml) e um período de aplicação (5 minutos) e lançaram mão diversas angulações do feixe de elétrons do microscópio para visualizar a textura superficial das amostras em vez do HMDS. Isso pode ter interferido na visualização da matriz de colágeno da dentina.

Além disso, o método de avaliação envolveu a mensuração da abertura de túbulos dentinários, e o parâmetro utilizado para classificar a exposição da matriz colágena foi a profundidade em que o cloridrato de tetraciclina foi capaz de penetrar na estrutura dental e promover tal exposição. Apesar das diferenças de método e dos resultados observados entre os dois estudos, é importante frisar que, em nosso estudo, a forma de aplicação que promoveu maior exposição de fibras colágenas nas concentrações de 50mg/ml e 75mg/ml (consideradas as mais eficazes para a biomodificação com cloridrato de tetraciclina) foi a fricção. Portanto, apesar da diferença nos resultados, as conclusões dos dois estudos são semelhantes com relação à forma de aplicação.

Outros resultados conflitantes com os obtidos neste estudo também foram observados^{43,57}. Demonstraram que o tempo de aplicação não é importante para a biomodificação com cloridrato de tetraciclina. A capacidade da raspagem e alisamento radicular em produzir a *smear layer* e a capacidade de remoção desta pelo cloridrato de tetraciclina na concentração de 250mg/ml aplicado por 30 segundos, 1, 3, 5 e 10 minutos com fricção suave, utilizando metodologia semelhante à do nosso estudo, foram avaliadas por Madison, Hokett⁵⁷ (1997). Os autores observaram, por meio de microscopia eletrônica de varredura, a remoção efetiva e homogênea de *smear layer* nos cinco diferentes tempos de aplicação. As amostras receberam score médio de 3,5 em uma escala de graus crescentes de remoção de *smear layer* que variava de 0 (sem

efeito sobre a *smear layer*) a 4 (remoção completa da *smear layer* com túbulos dentinários abertos e limpos). O fato da variável tempo não ter influenciado na remoção da *smear layer* pode ser atribuído à alta concentração de cloridrato de tetraciclina utilizada. Chama a atenção também o fato de os autores não encontrarem a *smear layer* formada por dissolução química da dentina. No entanto, algumas amostras apresentaram formação granular cristalina recobrando a superfície dental, o que foi atribuído à alta concentração de cloridrato de tetraciclina utilizada.

Isik et al.⁴³ 2000 aplicaram, por fricção, cloridrato de tetraciclina nas concentrações de 10mg/ml, 25mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml, 100mg/ml, 125mg/ml e 150mg/ml, nos tempos de 1, 3 e 5 minutos, sendo a solução renovada a cada 30 segundos, e avaliaram a remoção da *smear layer* e a abertura dos túbulos dentinários. Com exceção dos grupos de cloridrato de tetraciclina nas concentrações de 10mg/ml e 25mg/ml aplicadas durante 1 minuto, todos os outros apresentaram grau de abertura dos túbulos dentinários estatisticamente superior ao do grupo controle (água destilada), não havendo diferenças entre os tempos de aplicação. Com relação à concentração e à abertura de túbulos dentinários, houve certa concordância com o nosso estudo, sendo as concentrações entre 50mg/ml e 125mg/ml consideradas as mais eficientes. Os autores inferiram que a fricção do cloridrato de tetraciclina, que associa a ação mecânica à desmineralizante, é capaz de produzir

desmineralização em curto período de tempo. Os resultados conflitantes com os do nosso estudo podem ser atribuídos, mais uma vez, ao fato de esses autores terem utilizado dentes que nunca foram expostos ao meio bucal (terceiros molares inclusos) e que não receberam raspagem e alisamento radicular, o que pode ter influenciado na composição e na estrutura da *smear layer* formada. Além do mais, os autores utilizaram o diâmetro dos túbulos dentinários para avaliar a efetividade da biomodificação e não avaliaram a exposição da matriz de colágeno da dentina.

Trombelli et al.⁹⁷ (1995), testando o cloridrato de tetraciclina nas concentrações de 10mg/ml e 100mg/ml, nos tempos de aplicação de 1 e 4 minutos, encontraram, a partir da microscopia eletrônica de varredura, diferença somente entre os diferentes tempos de aplicação. Uma possível explicação para esses resultados, também conflitantes com os nossos, é que as amostras utilizadas pelos autores não receberam raspagem e alisamento radicular, somente instrumentação ultra-sônica e/ou rotatória. Isso certamente influenciou a formação de *smear layer* sobre as amostras, produzindo uma *smear layer* mais fácil de ser removida, o que pode ter impossibilitado que diferenças na capacidade biomodificadora das duas concentrações utilizadas fossem observadas. Além da característica da *smear layer*, a ação mecânica associada à fricção, conjuntas a um tempo de aplicação relativamente longo (4 minutos), podem ter contribuído para a eficácia da solução de 10mg/ml.

Corroborando os achados do nosso estudo, Sterrett et al.⁸⁹ (1997) verificaram a eficácia de concentrações de cloridrato de tetraciclina a partir de 75mg/ml na remoção de *smear layer* e na desmineralização da superfície dentinária por meio de microscopia eletrônica de varredura e que essa biomodificação dependia do tempo de aplicação, sendo os tempos de 3 e 5 minutos mais efetivos do que o tempo de 1 minuto.

Nossos resultados demonstraram que o condicionamento com cloridrato de tetraciclina pode produzir *smear layer* por dissolução química da dentina quando utilizado em concentrações a partir de 100mg/ml. A hiperdesmineralização foi relatada em estudos prévios^{23,59}, apresenta-se como uma camada sugestiva de proteína amorfa recobrendo a superfície dental e está relacionada à fricção de concentrações altas de cloridrato de tetraciclina (ou ácido cítrico). O fenômeno ocorre devido ao pH baixo e ao fato de que a fricção aumenta a ação do agente condicionante⁴³. Madison, Hokett⁵⁷ (1997), utilizando cloridrato de tetraciclina na concentração de 250mg/ml, não observaram dissolução química da dentina. Entretanto, relataram a formação de cristais (supostamente de cloridrato de tetraciclina) relativamente insolúveis, que resistiram à lavagem vigorosa com solução salina durante 20 segundos, sobre a superfície radicular de algumas amostras e atribuíram o fenômeno à alta concentração da solução de cloridrato de tetraciclina que foi utilizada. Outros estudos que utilizaram concentrações de cloridrato de tetraciclina iguais ou maiores que 100mg/ml e avaliaram a superfície

dental por meio de microscopia eletrônica de varredura não observaram dissolução química da dentina^{43,50,96,97}.

A alta frequência de escores 7 e 8 nas concentrações mais altas (Tabela 1), em especial nas de 200 mg/ml e 250mg/ml, foi um resultado inesperado do nosso estudo. Uma hipótese para tentar explicar esse resultado é que essas concentrações mais altas de solução de cloridrato de tetraciclina possuem maior tensão superficial, o que poderia ter prejudicado sua ação sobre as amostras. De fato, verificamos que todas as amostras das concentrações de 200 mg/ml e 250mg/ml que apresentaram escores 7 ou 8 receberam aplicação passiva da solução de cloridrato de tetraciclina e que todas as amostras tratadas com concentrações a partir de 75mg/ml e apresentaram escores 7 ou 8 receberam a aplicação passiva. Ainda, corroborando essa hipótese, dentro dos grupos de cloridrato de tetraciclina houve uma relação inversamente proporcional entre a frequência de escores 7 ou 8 e o tempo de aplicação (48 amostras com escores 7 ou 8 que receberam aplicação de 1 minuto, 36 de 2 minutos e 29 de 3 minutos).

A hipótese da influência da tensão superficial do agente condicionante sobre sua atuação já foi levantada em estudos prévios⁷⁰, o que levou Sampaio et al.⁸³ (2003) e Carvalho Batista et al.²⁰ (2005) a testarem a adição do detergente Texapon ao agente condicionante para reduzir a tensão superficial e melhorar o espalhamento e, conseqüentemente, a sua atuação sobre a superfície tratada. Nossos

resultados sugerem que a atuação das soluções de concentrações altas de cloridrato de tetraciclina foi otimizada por meio da ação mecânica do pincel ou pela fricção do algodão sobre a superfície tratada e pelo aumento no tempo de aplicação.

Todos os parâmetros avaliados no presente estudo, concentração, forma e tempo de aplicação, influenciaram a biomodificação radicular. Exemplificando, foi possível observar a maior frequência de escores 1 e 2 com as concentrações de 50mg/ml e 75mg/ml, aplicadas durante 2 minutos por fricção, ou a tendência de aumento da frequência de escores 5 conforme o aumento da concentração do cloridrato de tetraciclina, do tempo de aplicação e da ação mecânica (representada pela fricção, na qual a frequência de escores 5 foi maior). Portanto, é importante notar que, quanto maior a concentração do cloridrato de tetraciclina, maior será sua ação desmineralizante e menor será seu poder de penetração devido à maior tensão superficial, o que, dependendo da situação, pode ser compensado pelo tempo (quanto maior, maior a ação do agente condicionante) e pela forma de aplicação (quanto maior a ação mecânica, maior a ação do agente biomodificante). Isso é relevante para a aplicação da biomodificação com cloridrato de tetraciclina em estudos in vivo, indicando a necessidade de se avaliar, criteriosamente, fatores que influenciem no grau de mineralização da superfície radicular tratada, tais como a idade do animal ou do paciente, o tempo em que a superfície

radicular tratada está exposta ao meio bucal ou à bolsa periodontal, a presença de lesões de abrasão provocadas por escovação vigorosa e o histórico de tratamento para hipersensibilidade dentinária cervical com substâncias que promovem mineralização da superfície radicular, como é o caso dos vernizes à base de flúor. Essa avaliação possibilitaria uma adequação individualizada dos parâmetros para cada caso sem, contudo, se distanciar muito dos parâmetros ideais.

Um outro fator que devemos levar em consideração quando da aplicação in vivo do cloridrato de tetraciclina é o pH, visto que, quanto mais alta a concentração, menor será o pH. A implicação está no fato de que quanto mais ácida for a substância, maiores serão as possibilidades de provocar necrose tecidual. A partir dessa premissa, o tempo de aplicação e, principalmente, a forma de aplicação (a fricção aumenta a eficiência do agente condicionante e, portanto, permite a redução tanto da concentração do cloridrato de tetraciclina como do tempo em que o mesmo fica em contato com os tecidos) tornam-se parâmetros valiosos na tentativa de minimizar o efeito citotóxico do cloridrato de tetraciclina.

Ao se determinar, por meio de microscopia eletrônica de varredura, os parâmetros mais efetivos da aplicação do cloridrato de tetraciclina na produção de alterações morfológicas (biomodificação), obtém-se o subsídio para a realização de estudos in vivo para verificar a resposta biológica dos tecidos à biomodificação. Embora existam relatos in vivo apontando benefícios oriundos da biomodificação com o cloridrato

de tetraciclina^{20,45} e relatos que não encontraram tais benefícios^{3,56}, é preciso enfatizar que nossos resultados permitiram determinar claramente os melhores parâmetros para a utilização desse agente (que podem ser utilizados no desenho experimental de futuros estudos in vivo) e que, a biomodificação por meio do cloridrato de tetraciclina pode ser utilizada também em combinação com outros agentes biomodificadores⁴⁵, com o emprego de moléculas sinalizadoras^{32,62,106} e com técnicas mucogengivais¹⁸ e regenerativas³⁷, de forma a somar efeitos.

7 CONCLUSÃO

7 Conclusão

Concluimos que concentrações de 50mg/ml ou 75mg/ml, aplicadas por pincelamento ou por fricção durante 2 a 3 minutos, são os parâmetros mais eficazes para promover a biomodificação radicular utilizando-se o cloridrato de tetraciclina.

8 REFERÊNCIAS

8 Referências*

1. Acharya MR, Venitz J, Figg WD, Sparreboom A. Chemically modified tetracyclines as inhibitors of matrix metalloproteinases. *Drug Resist Updat.* 2004; 7:195–208.
2. Adriaens PA, De Boever JA, Loesche WJ. Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. A reservoir of periodontopathic bacteria. *J Periodontol.* 1988;59:222-30.
3. Aleo JJ, DeRenzis FA, Farber Pa. In vitro attachment of human gingival fibroblasts to root surfaces. *J Periodontol* 1975;46:639-45.
4. Alger FA, Solt CW, Vuddhakanok S, Miles K. The histologic evaluation of new attachment in periodontally diseased human roots treated with tetracycline-hydrochloride and fibronectin. *J Periodontol.* 1990;6:447-55.
5. Babay N. Nondiseased dentinal root surface following citric acid or tetracycline hydrochloride conditioning: a scanning electron microscopic study on the effects of ultrasonic irrigation before and after root conditioning. *Quintessence Int.* 1997;28:93-7.
6. Baker DL, Stanley Pavlow SA, Wikesjo UM. Fibrin clot adhesion to dentin conditioned with protein constructs: an in vitro proof-of-principle study. *J Clin Periodontol.* 2005;32:561-6.

*De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

7. Baker PJ, Evans RT, Coburn RA, Genco RJ. Tetracycline and its derivatives strongly bind to and are released from the tooth surface in active form. *J Periodontol.* 1983;54:580-5.
8. Baker PJ, Rotch HA, Trombelli L, Wikesjo UM. An in vitro screening model to evaluate root conditioning protocols for periodontal regenerative procedures. *J Periodontol.* 2000;71:1139-43.
9. Baker PJ, Slots J, Genco RJ, Evans RT. Minimal inhibitory concentrations of various antimicrobial agents for human oral anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1983;24:420-4.
10. Bal B, Eren K, Balos K. Effects of various root surface treatments on initial clot formation: a scanning electron microscope study. *J Nihon Univ Sch Dent.* 1990;32:281-93.
11. Bergenholtz A, Babay N. Scanning electron microscopy of the root surface texture of extracted periodontally diseased teeth following various etching and chelating regimens. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1998;18:171-9.
12. Blomlöf J, Lindskog S. Periodontal tissue-vitality after different etching modalities. *J Clin Periodontol.* 1995;22:464-8.
13. Blomlöf J, Lindskog S. Root surface texture and early cell and tissue colonization after different etching modalities. *Eur J Oral Sci.* 1995;103:17-24.
14. Blomlöf J, Blomlöf L, Lindskog S. Effect of different concentrations of EDTA on smear layer removal and collagen exposure in

- periodontitis-affected root surfaces. *J Clin Periodontol* 1997;24:534-7.
15. Blomlöf J, Jansson L, Blomlöf L, Lindskog S. Root surface etching at neutral pH promotes periodontal healing. *J Clin Periodontol*. 1996;23:50-5.
16. Blomlöf L, Bergman E, Forsgardh A, Foss L, Larsson A, Sjöberg B. A clinical study of root surface conditioning with an EDTA gel. I. Non surgical periodontal treatment. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000;20:560-5.
17. Bonito AJ, Lux L, Lohr KN. Impact of local adjuncts to scaling and root planing in periodontal disease therapy: a systematic review. *J Periodontol*. 2005;76:1227-36.
18. Bouchard P, Nilveus R, Etienne D. Clinical evaluation of tetracycline HCl conditioning in the treatment of gingival recessions. A comparative study. *J Periodontol*. 1997;68:262-9.
19. Bulman JS, Osborn JF. Measuring diagnostic consistency. *Br Dent J*. 1989;166:377-81.
20. Carvalho Batista LH, Cezar Sampaio JE, Pilatti GL, Shibli JA. Efficacy of EDTA-T gel for smear layer removal at root surfaces. *Quintessence Int*. 2005;36:551-8.
21. Chandra RV, Jagetia GC, Bhat KM. The attachment of V79 and human periodontal ligament fibroblasts on periodontally involved root surfaces following treatment with EDTA, citric acid, or

- tetracycline HCL: an SEM in vitro study. *J Contemp Dent Pract.* 2006;7:44-59.
22. Claffey N, Bogle G, Bjorvatn K, Selvig KA, Egelberg J. Topical application of tetracycline in regenerative periodontal surgery in beagles. *Acta Odontol Scand.* 1987;45:141-6.
23. Codelli GR, Fry HR, Davis JW. Burnished versus nonburnished application of citric acid to human diseased root surfaces: the effect of time and method of application. *Quintessence Int.* 1991;22:277-83.
24. Cohen M, Garnick JJ, Ringle RD, Hanes PJ, Thompson WO. Calcium and phosphorus content of roots exposed to the oral environment. *J Clin Periodontol.* 1992;19:268-73.
25. D'Agostino P, Arcolego F, Barbera C, Di Bella G, La Rosa M, Misiano G, et al. Tetracycline inhibits the nitric oxide synthase activity induced by endotoxin in cultured murine macrophages. *Eur J Pharmacol.* 1998;346:283-90.
26. Daly GC. Antibacterial effect of citric acid treatment of periodontally diseased root surfaces in vitro. *J Clin Periodontol* 1982;9:986-92.
27. Delazari FM, Gerlach RF, Joly JC, de Lima AF. Scanning electron microscopy study of the effect of tetracycline HCl on smear layer removal and fibrin network formation. *Braz Dent J.* 1999;10:81-7.

28. Erdinc M, Efeoglu A, Demirel K. Clinical evaluation of the effect of tetracycline hydrochloride root conditioning during flap surgery. *Periodontal Clin Investig.* 1995;17:6-9.
29. Fardal O, Lowenberg BF. A quantitative analysis of the migration, attachment, and orientation of human gingival fibroblasts to human dental root surfaces in vitro. *J Periodontol.* 1990;61:529-35.
30. Fine DH, Morris ML, Tabak L, Cole JD. Preliminary characterization of material eluted from the roots of periodontally diseased teeth. *J Periodontal Res.* 1980;15:10-9.
31. Finkelman RD, Mohan S, Jennings JC, Taylor AK, Jepsen S, Baylink DJ. Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF-beta in human dentin. *J Bone Miner Res.* 1990;5:717-23.
32. Gamal AY, Mailhot JM, Garnick JJ, Newhouse R, Sharawy MM. Human periodontal ligament fibroblast response to PDGF-BB and IGF-1 application on tetracycline HCl conditioned root surfaces. *J Clin Periodontol.* 1998;25:404-12.
33. Giuliana G, Ammatuna P, Pizzo G, Capone F, D'Angelo M. Occurrence of invading bacteria in radicular dentin of periodontally diseased teeth: microbiological findings. *J Clin Periodontol.* 1997;24:478-85.
34. Gomes BC, Golub LM, Ramamurthy NS. Tetracyclines inhibit parathyroid hormone-induced bone resorption in organ culture. *Experientia.* 1984;40:1273-5.

35. Hanes PJ, O'Brien NJ, Garnick JJ. A morphological comparison of radicular dentin following root planning and treatment with citric acid or tetracycline HCL. *J Clin Periodontol.* 1991; 18:660-8.
36. Hanes PJ, Polson AM, Frederick GT. Initial wound healing attachments to demineralized dentin. *J Periodontol.* 1988;59:176-83.
37. Harris RJ. Treatment of furcation defects with an allograft-alloplast-tetracycline composite bone graft combined with GTR: human histologic evaluation of a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2002;22:381-7.
38. Heitz-Mayfield L, Tonetti MS, Cortellini P, Lang NP. On behalf of European Research Group on Periodontology (ERGOPERIO). Microbial colonization patterns predict the outcomes of surgical treatment of intrabony defects. *J Clin Periodontol* 2006; 33: 62–8.
39. Hung SL, Lin YW, Chen YT, Ling LJ. Attachment of periodontal ligament cells onto various antibiotics-loaded GTR membranes. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2005;25:265-75.
40. Inoue K, Kumakura S, Uchida M, Tsutsui T. Effects of eight antibacterial agents on cell survival and expression of epithelial-cell- or cell-adhesion-related genes in human gingival epithelial cells. *J Periodontal Res.* 2004;39:50-8.
41. Inoue T, Deporter DA, Melcher AH. Induction of cartilage and bone by dentin demineralized in citric acid. *J Periodont Res.* 1986;21:243–55.

42. Inoue T, Deporter DA, Melcher AH. Induction of chondrogenesis in muscle, skin, bone marrow, and periodontal ligament by demineralized dentin and bone matrix in vivo and in vitro. *J Dent Res.* 1986;65:12–22.
43. Isik AG, Tarim B, Hafez AA, Yalcin FS, Onan U, Cox CF. A comparative scanning electron microscopic study on the characteristics of demineralized dentin root surface using different tetracycline HCl concentrations and application times. *J Periodontol.* 2000;71:219-25.
44. Isik G, Ince S, Saglam F, Onan U. Comparative SEM study on the effect of different demineralization methods with tetracycline HCl on healthy root surfaces. *J Clin Periodontol.* 1997;24:589-94.
45. Jeong SN, Han SB, Lee SW, Magnusson I. Effects of tetracycline-containing gel and a mixture of tetracycline and citric acid-containing gel on non-surgical periodontal therapy. *J Periodontol.* 1994;65:840-7.
46. Karp W, Sodek J, Aubin JE, Melcher AH. A comparison of fibronectin and laminin binding to undemineralized and demineralized tooth root surfaces. *J Periodontal Res.* 1986;21:30-8.
47. King GN, King N, Hughes FJ. The effect of root surface demineralization on bone morphogenetic protein-2-induced healing of rat periodontal fenestration defects. *J Periodontol.* 1998;69:561-70.

48. Kleinfelder JW, Muller RF, Lange DE. Antibiotic susceptibility of putative periodontal pathogens in advanced periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 1999;26:347-51.
49. Kleinman HK, Klebe RJ, Martin GR. Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *J Cell Biol.* 1981;88:473-85.
50. Labahn R, Fahrenbach WH, Clark SM, Lie T, Adams DF. Root dentin morphology after different modes of citric acid and tetracycline hydrochloride conditioning. *J Periodontol.* 1992;63:303-9.
51. Lafferty TA, Gher ME, Gray JL. Comparative SEM study on the effect of acid etching with tetracycline HCl or citric acid on instrumented periodontally-involved human root surfaces. *J Periodontol.* 1993;64:689-93.
52. Leite FR, Moreira CS, Theodoro LH, Sampaio JE. Blood cell attachment to root surfaces treated with EDTA gel. *Pesqui Odontol Bras.* 2005;19:88-92.
53. Lie T, Bruun G, Boe OE. Effects of topical metronidazole and tetracycline in treatment of adult periodontitis. *J Periodontol.* 1998;69:819-27.
54. Lopez NJ, Belvederessi M, de la Sotta R. Inflammatory effects of periodontally diseased cementum studied by autogenous dental root implants in humans. *J Periodontol.* 1980;51:582-93.

55. Lowenberg B, Thibault J, Lawrence C, Sodek J. The influence of chemically-induced modifications of root surfaces on cell migration, attachment, and orientation. *J Dent Res.* 1986;65:1010-5.
56. Machtei EE, Dunford RG, Norderyd OM, Zambon JJ, Genco RJ. Guided tissue regeneration and anti-infective therapy in the treatment of class II furcation defects. *J Periodontol.* 1993;64:968-73.
57. Madison JG 3rd, Hokett SD. The effects of different tetracyclines on the dentin root surface of instrumented, periodontally involved human teeth: a comparative scanning electron microscope study. *J Periodontol.* 1997;68:739-45.
58. Mariotti A. Efficacy of chemical root surface modifiers in the treatment of periodontal disease. A systematic review. *Ann Periodontol.* 2003;8:205-26.
59. Mata AC. Avaliação do cloridrato de tetraciclina na remoção da “smear layer” radicular, em diferentes concentrações, tempos e modos de aplicação. Análise através de microscopia eletrônica de varredura [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2002.
60. McAllister B, Narayanan AS, Miki Y, Page RC. Isolation of a fibroblast attachment protein from cementum. *J Periodontal Res.* 1990;25:99-105.

61. Milano S, Arcoleo F, D'Agostino P, Cillari E. Intraperitoneal injection of tetracyclines protects mice from lethal endotoxemia downregulating inducible nitric oxide synthase in various organs and cytokine and nitrate secretion in blood. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:117-21.
62. Miyaji H, Sugaya T, Kato K, Kawamura N, Tsuji H, Kawanami M. Dentin resorption and cementum-like tissue formation by bone morphogenetic protein application. *J Periodontal Res.* 2006;41:311-5.
63. Morris ML. The implantation of decalcified human dentin and cementum into the subcutaneous tissues of the rat. *J Periodontal Res.* 1967;2:273-81.
64. Nagata MJ, Bosco AF, Leite CM, Melo LG, Sundefeld ML. Healing of dehiscence defects following root surface demineralization with tetracycline: a histologic study in monkeys. *J Periodontol.* 2005;76:908-14.
65. Okte E, Unsal B, Bal B, Erdemli E, Akbay A. Histological assessment of root cementum at periodontally healthy and diseased human teeth. *J Oral Sci.* 1999;41:177-80.
66. Olson RH, Adams DF, Layman DL. Inhibitory effect of periodontally diseased root extract on the growth of human gingival fibroblasts. *J Periodontol.* 1985;58:592-6.

67. Omori N, Kobayashi H, Tsutsui T. Quantitative comparison of cytotoxic effects of tetracyclines and fluoroquinolones on human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res.* 1999;34:290-5.
68. Parashis AO, Mitsis FJ. Clinical evaluation of the effect of tetracycline root preparation on guided tissue regeneration in the treatment of Class II furcation defects. *J Periodontol.* 1993;64:133-6.
69. Park JB, Matsuura M, Han KY, Norderyd O, Lin WL, Genco RJ, et al. Periodontal regeneration in class III furcation defects of beagle dogs using guided tissue regenerative therapy with platelet-derived growth factor. *J Periodontol.* 1995;66:462-77.
70. Pilatti GL, Sampaio JE. Estudo *in vitro* da eficácia de um gel de EDTA na remoção da "smear layer" da superfície radicular. *Rev Pós Grad* 2005;12:111-7.
71. Polson AM, Frederick GT, Ladenheim S, Hanes PJ. The production of a root surface smear layer by instrumentation and its removal by citric acid. *J Periodontol.* 1984;55:443-6.
72. Polson AM, Proye MP. Fibrin linkage: a precursor for new attachment. *J Periodontol.* 1983;54:141-7.
73. Postlethwaite AE, Seyer JM, Kang AH. Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, and III collagens and collagen-derived peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978;75:871-5.
74. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *Pharmacology.* 3rd ed. New York: Churchill Livingstone; 2001.

75. Register AA. Bone and cementum induction by dentin, demineralized in situ. *J Periodontol.* 1973;44:49-54.
76. Register AA. Induced reattachment in periodontic-endodontic lesions by root demineralization in situ. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1978;45:774-83.
77. Register AA, Burdick FA. Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized in situ. I. Optimum range. *J Periodontol.* 1975;46:646-55.
78. Register AA, Burdick FA. Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized in situ. II. Defect repair. *J Periodontol.* 1976;47:497-505.
79. Ririe CM, Crigger M, Selvig KA. Healing of periodontal connective tissues following surgical wounding and application of citric acid in dogs. *J Periodontal Res.* 1980;15:314-27.
80. Romano F, Torta I, Debernardi C, Aimetti M. Debridement and local application of tetracycline in the management of persistent periodontitis. Clinical and microbiological results after 12 months. *Minerva Stomatol.* 2005;54:43-51.
81. Rompen EH, Goffinet GH, Nusgens B. Human periodontal ligament fibroblast behavior on chemically conditioned dentine: an in vitro study. *J Periodontol.* 1999;70:1144-52.
82. Ruggeri A Jr, Prati C, Mazzoni A, Nucci C, Di Lenarda R, Mazzotti G, Breschi L. Effects of citric acid and EDTA conditioning on

- exposed root dentin: An immunohistochemical analysis of collagen and proteoglycans. *Arch Oral Biol.* 2007;52:1-8.
83. Sampaio JE, Rached RS, Pilatti GL, Theodoro LH, Batista LH. Effectiveness of EDTA and EDTA-T brushing on the removal of root surface smear layer. *Pesqui Odontol Bras.* 2003;17:319-25.
84. SAMPAIO JEC. Eficiência de detergentes e EDTA na remoção da "smear layer" de superfícies radiculares submetidas a raspagem e aplainamento: análise através da microscopia eletrônica de varredura [Livre Docência em Periodontia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 1999.
85. Sampaio LM. Eficiência do cloridrato de tetraciclina na remoção da "smear layer", após instrumentação radicular; em diferentes concentrações, tempos e modos de aplicação. Análise através de microscopia eletrônica de varredura [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2001.
86. Selvig KA, Bogle G, Claffey NM. Collagen linkage in periodontal connective tissue reattachment. An ultrastructural study in beagle dogs. *J Periodontol.* 1988;59:758-68.
87. Selvig KA, Ririe CM, Nilveus R, Egelberg J. Fine structure of new connective tissue attachment following acid treatment of experimental furcation pockets in dogs. *J Periodontal Res.* 1981;16:123-9.

88. Shapira L, Houry Y, Barak V, Halabi A, Soskolne WA, Stabholz A. Human monocyte response to cementum extracts from periodontally diseased teeth: effect of conditioning with tetracycline. *J Periodontol.* 1996;67:682-7.
89. Sterrett JD, Simmons J, Whitford G, Russell CM. Tetracycline demineralization of dentin: the effects of concentration and application time. *J Clin Periodontol.* 1997;24:457-63.
90. Stewart HT. Partial removal of cementum and decalcification of tooth in the treatment of pyorrhea alveolaris. *Dent Cosmos.* 1899; 41:617.
91. Sutter VL, Jones MJ, Ghoneim AT. Antimicrobial susceptibilities of bacteria associated with periodontal disease. *Antimicrob Agents Chemother.* 1983;23:483-6.
92. Takata T, D'Errico JA, Atkins KB, Berry JE, Strayhorn C, Taichman RS, et al. Protein extracts of dentin affect proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in vitro. *J Periodontol.* 1998;69:1247-55.
93. Tay FR, Kwong SM, Itthagarun A, King NM, Yip HK, Moulding KM, et al. Bonding of a self-etching primer to non-carious cervical sclerotic dentin: interfacial ultrastructure and microtensile bond strength evaluation. *J Adhes Dent.* 2000;2:9-28.
94. Terranova VP, Franzetti LC, Hic S, DiFlorio RM, Lyall RM, Wikesjo UM, et al. A biochemical approach to periodontal regeneration:

- tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth. *J Periodontal Res.* 1986;21:330-7.
95. Tonetti MS, Cortellini P, Carnevale G, Cattabriga M, de Sanctis M, Pini Prato GP. A controlled multicenter study of adjunctive use of tetracycline periodontal fibers in mandibular class II furcations with persistent bleeding. *J Clin Periodontol.* 1998;25:728-36.
96. Trombelli L, Scabbia A, Calura G. Nondiseased cementum and dentin root surface following tetracycline hydrochloride conditioning: SEM study of the effects of solution concentration and application time. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1994;14:460-9.
97. Trombelli L, Scabbia A, Zangari F, Griselli A, Wikesjo UM, Calura G. Effect of tetracycline HCl on periodontally-affected human root surfaces. *J Periodontol.* 1995;66:685-91.
98. Vanheusden AJ, Goffinet G, Zahedi S, Nusgens B, Lapiere CM, Rompen EH. In vitro stimulation of human gingival epithelial cell attachment to dentin by surface conditioning. *J Periodontol.* 1999;70:594-603.
99. Walker CB, Gordon JM, McQuilkin SJ, Niebloom TA, Socransky SS. Tetracycline: levels of achievable in gingival crevice fluid and in vitro effect on subgingival organisms. Part II. Susceptibilities of periodontal bacteria. *J Periodontol.* 1981;52:613-6.
100. Wang Y, Morlandt AB, Xu X, Carnes DL Jr, Chen Z, Steffensen B. Tetracycline at subcytotoxic levels inhibits matrix metalloproteinase-

- 2 and -9 but does not remove the smear layer. *J Periodontol.* 2005;76:1129-39.
101. Weinberg JM. The anti-inflammatory effects of tetracyclines. *Cutis.* 2005;75(4 Suppl):6-11.
102. Wikesjö UME, Nilveus R, Selvig KA. Significance of early healing events on periodontal repair: a review. *J Periodontol.* 1992;63:158-65.
103. Wikesjö UME, Baker PJ, Christersson LA, Genco RJ, Lyall RM, Hic S, et al. A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment conditions dentin surfaces. *J Periodontal Res.* 1986;21:322-9.
104. Wirthlin MR, Pederson ED, Hancock EB, Lamberts BL, Leonard EP. The hypermineralization of diseased root surfaces. *J Periodontol.* 1979;50:125-7.
105. Younger WJ. Lactic Acid in pyorrhea. *Am J Dent Sci.* 1897/98; 31:334.
106. Zaman KU, Sugaya T, Kato H. Effect of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and bone morphogenetic protein-2 application to demineralized dentin on early periodontal ligament cell response. *J Periodontal Res.* 1999;34:244-50.

ANEXO 1

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



Comitê de Ética em Pesquisa

Certificado

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**REMOÇÃO DA 'SMOAR LAYER' RADICULAR ATRAVÉS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, MODOS E TEMPOS DE APLICAÇÃO DE DIFERENTES SUBSTÂNCIAS. AVALIAÇÃO ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA**" sob o protocolo nº 25/02, e o relatório final de responsabilidade do (a) Pesquisador (a) **OSÉ EDUARDO CEZAR SAMPAIO**, estão de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOAr.

Araraquara, 03 de dezembro de 2004.


Prof.ª Dr.ª **Marian Aparecida Onofre**
Coordenadora

ANEXO 2

Anexo 2

As amostras marcadas em azul foram as utilizadas para o cálculo do coeficiente de reprodutibilidade intra-examinador (kappa).

Grupo I (soro fisiológico) Aplicação passiva

FOTO	1ª LEITURA	2ª LEITURA	3ª LEITURA	ESCORE
1 minuto				
291146	8	8	8	8
291149	8	8	8	8
291138	7	7	7	7
291123	8	8	8	8
291155	8	8	8	8
2 minutos				
291132	7	7	7	7
291160	8	8	8	8
000128	7	7	7	7
291188	8	8	8	8
291130	7	7	7	7
3 minutos				
000106	8	8	8	8
000156	8	8	8	8
201112	8	8	8	8
291154	7	7	7	7
000140	7	7	7	7

Grupo I (soro fisiológico) Aplicação por fricção

FOTO	1ª LEITURA	2ª LEITURA	3ª LEITURA	ESCORE
1 minuto				
000104	6	6	6	6
000122	7	7	7	7
000120	6	6	6	6
000160	7	7	7	7
000144	6	6	6	6
2 minutos				
000116	6	6	6	6
000164	7	6	7	7
291176	7	6	7	7
000134	7	6	6	6
291140	7	7	7	7
3 minutos				
000138	4	4	4	4
000172	7	6	7	7
000150	4	6	4	4
291196	6	4	6	6
000102	6	6	6	6

Grupo I (soro fisiológico) Aplicação por pincel

FOTO	1ª LEITURA	2ª LEITURA	3ª LEITURA	ESCORE
1 minuto				
000108	7	7	7	7
000112	8	8	8	8
291162	7	7	7	7
000126	7	7	7	7
000136	8	8	8	8
2 minutos				
000110	7	7	7	7
000154	7	7	7	7
000132	8	8	7	8
000142	7	7	7	7
000170	7	7	7	7
3 minutos				
000148	7	7	7	7
000158	7	7	7	7
291186	7	7	7	7
291168	7	7	7	7
000182	7	7	7	7

Grupo II (TTC-HCl 10mg/ml) Aplicação passiva

FOTO	1ª LEITURA	2ª LEITURA	3ª LEITURA	ESCORE
1 minuto				
000146	8	8	8	8
000124	7	7	7	7
291178	7	7	7	7
291172	6	7	6	6
000152	8	8	8	8
2 minutos				
000180	7	7	6	7
000184	4	7	7	7
000176	7	7	7	7
291198	7	7	8	7
291194	6	7	7	7
3 minutos				
000174	6	6	6	6
201120	8	8	8	8
000168	4	4	4	4
000114	7	7	7	7
000162	7	7	7	7

Grupo II (TTC-HCl 10mg/ml) Aplicação por fricção

Foto	1ª LEITURA	2ª LEITURA	3ª LEITURA	ESCORE
1 minuto				
000166	4	4	3	4
291180	4	4	4	4
291114	4	4	4	4
291134	6	4	6	6
291190	6	7	6	6
2 minutos				
291118	4	4	6	4
291116	1	1	1	1
291102	6	4	4	4
291126	3	4	3	3
291108	3	3	3	3
3 minutos				
190106	3	4	4	4
100114	2	2	2	2
190128	4	6	4	4
120530	1	1	1	1
120508	1	1	1	1

Grupo II (TTC-HCl 10mg/ml) Aplicação por pincel

Foto	1ª LEITURA	2ª LEITURA	3ª LEITURA	ESCORE
1 minuto				
291136	7	7	7	7
29116	7	7	7	7
291170	6	4	4	4
291143	6	6	6	6
291128	7	6	6	6
2 minutos				
291152	6	6	6	6
291106	7	7	7	7
291110	6	7	7	7
291174	6	6	6	6
291184	6	6	6	6
3 minutos				
291182	4	6	4	4
291142	6	6	6	6
291192	6	6	6	6
000118	7	7	7	7
291104	7	6	6	6

Grupo III (TTC-HCl 25mg/ml) Aplicação passiva

Foto	1ª LEITURA	2ª LEITURA	3ª LEITURA	ESCORE
1 minuto				
000211	8	7	8	8
000203	8	8	8	8
000223	7	7	8	7
000221	7	7	8	7
000215	8	8	8	8
2 minutos				
000219	7	7	8	7
000227	8	8	8	8
000209	7	7	8	7
000213	8	8	8	8
000212	8	8	8	8
3 minutos				
130287	7	7	7	7
130249	7	7	7	7
130235	4	4	4	4
130285	1	1	1	1
130279	6	6	6	6

Grupo III (TTC-HCl 25mg/ml) Aplicação por fricção

Foto	1ª LEITURA	2ª LEITURA	3ª LEITURA	ESCORE
1 minuto				
000130	2	2	2	2
201122	3	3	4	3
291158	6	6	6	6
291148	3	3	3	3
291164	3	3	3	3
2 minutos				
120512	2	2	2	2
120598	2	2	3	2
120554	3	3	3	3
190102	2	3	3	3
190120	4	4	4	4
3 minutos				
120596	3	3	2	3
120590	1	1	1	1
190108	4	4	4	4
190104	2	3	3	3
190126	3	3	2	3

Grupo III (TTC-HCl 25mg/ml) Aplicação por pincel

Foto	1ª LEITURA	2ª LEITURA	3ª LEITURA	ESCORE
1 minuto				
000225	6	6	6	6
000199	7	8	8	8
000193	7	7	7	7
000207	7	7	7	7
000201	6	6	6	6
2 minutos				
000188	1	1	1	1
000186	1	1	1	1
000205	4	4	4	4
000195	1	1	1	1
000197	6	6	6	6
3 minutos				
130233	3	3	3	3
130257	3	3	3	3
130243	7	7	7	7
130253	6	6	6	6
130273	6	6	6	6

Grupo IV (TTC-HCl 50mg/ml) Aplicação passiva

Foto	1ª LEITURA	2ª LEITURA	3ª LEITURA	ESCORE
1 minuto				
130231	6	6	6	6
130239	8	8	8	8
130281	6	7	6	6
130229	6	6	6	6
130265	6	6	6	6
2 minutos				
130237	6	6	6	6
130247	6	6	6	6
130277	4	4	4	4
130267	6	6	6	6
130261	6	6	6	6
3 minutos				
130275	7	7	7	7
130251	6	6	6	6
130263	4	4	4	4
130241	6	6	7	6
130283	7	7	7	7

Grupo IV (TTC-HCl 50mg/ml) Aplicação por fricção

Foto	1ª LEITURA	2ª LEITURA	3ª LEITURA	ESCORE
1 minuto				
130271	3	3	4	3
130269	1	1	1	1
130275	4	4	4	4
130255	3	4	3	3
130259	1	1	2	1
2 minutos				
120574	1	1	1	1
190154	2	2	2	2
190100	1	1	1	1
190140	1	1	1	1
120592	1	1	1	1
3 minutos				
190144	1	1	1	1
190134	2	2	2	2
190141	2	2	2	2
190116	1	1	1	1
120581	1	1	1	1

Grupo IV (TTC-HCl 50mg/ml) Aplicação por pincel

Foto	1ª LEITURA	2ª LEITURA	3ª LEITURA	ESCORE
1 minuto				
190118	4	4	4	4
190148	6	6	6	6
120572	8	7	7	7
120586	6	6	6	6
120564	4	4	4	4
2 minutos				
120566	4	4	4	4
120542	1	1	1	1
190160	1	1	1	1
120556	2	2	1	2
120518	1	1	1	1
3 minutos				
120548	2	2	2	2
120534	6	6	6	6
120540	3	3	3	3
120538	4	4	4	4
120524	6	6	6	6

Grupo V (TTC-HCl 75mg/ml) Aplicação passiva

Foto	1ª LEITURA	2ª LEITURA	3ª LEITURA	ESCORE
1 minuto				
120506	7	7	8	7
120528	7	7	7	7
120526	6	6	6	6
120516	7	7	7	7
120520	6	6	6	6
2 minutos				
120578	6	6	6	6
120576	4	6	6	6
120532	1	1	1	1
120552	8	8	8	8
190112	7	7	7	7
3 minutos				
120522	7	7	7	7
120502	4	4	4	4
120549	4	4	4	4
120536	4	4	4	4
190158	6	6	6	6

Grupo V (TTC-HCl 75mg/ml) Aplicação por fricção

Foto	1ª LEITURA	2ª LEITURA	3ª LEITURA	ESCORE
1 minuto				
120588	3	3	3	3
190110	1	1	1	1
190152	1	1	1	1
190170	3	3	3	3
190136	1	1	1	1
2 minutos				
120568	1	1	1	1
190162	1	1	1	1
190122	4	4	4	4
190168	1	1	1	1
190166	1	1	1	1
3 minutos				
120509	4	4	4	4
120580	3	3	3	3
190150	2	2	2	2
190146	4	3	3	3
190156	2	2	2	2

Grupo V (TTC-HCl 75mg/ml) Aplicação por pincel

Foto	1ª LEITURA	2ª LEITURA	3ª LEITURA	ESCORE
1 minuto				
120544	4	3	4	4
120578	4	4	6	4
190164	3	3	3	3
190132	4	4	6	4
190124	6	4	4	4
2 minutos				
120584	1	1	1	1
120546	2	2	2	2
120558	2	2	2	2
120568	1	1	1	1
120594	1	1	1	1
3 minutos				
120514	2	2	3	2
120504	4	3	4	4
120562	2	1	2	2
190130	1	1	1	1
190138	2	3	2	2

Grupo VI (TTC HCl 100mg/ml) Aplicação passiva

Foto	1ª LEITURA	2ª LEITURA	3ª LEITURA	ESCORE
1 minuto				
110953	4	2	4	4
110955	6	6	6	6
110111	8	8	8	8
120931	4	4	6	4
120937	8	8	8	8
2 minutos				
120919	4	4	4	4
120933	4	4	4	4
120947	8	8	8	8
120949	8	8	8	8
120973	6	6	6	6
3 minutos				
110929	8	8	7	8
110961	6	5	6	6
110965	6	6	7	6
110989	6	8	6	6
120917	8	7	8	8

Grupo VI (TTC HCl- 100mg/ml) Aplicação por fricção

Foto	1ª LEITURA	2ª LEITURA	3ª LEITURA	ESCORE
1 minuto				
110915	5	5	5	5
110917	2	2	3	2
110941	3	2	3	3
110975	2	2	3	2
120939	5	5	5	5
2 minutos				
110921	5	5	5	5
110923	5	5	5	5
110945	5	5	5	5
110995	2	3	3	3
120923	5	5	5	5
3 minutos				
110987	5	5	5	5
110101	1	2	1	1
110105	5	5	5	5
110109	5	5	5	5
120955	5	5	5	5

Grupo VI (TTC HCl- 100mg /ml) Aplicação por pincel

Foto	1ª LEITURA	2ª LEITURA	3ª LEITURA	ESCORE
1 minuto				
260117	6	6	7	6
281121	8	8	8	8
281133	3	3	1	3
281163	1	1	1	1
281183	6	5	6	6
2 minutos				
261145	1	1	1	1
281107	6	6	6	6
281141	2	1	1	1
281161	1	1	1	1
281181	1	3	3	3
3 minutos				
261115	1	2	1	1
261139	1	1	1	1
261141	1	1	1	1
261143	1	1	1	1
281109	1	1	1	1

Grupo VII (TTC HCl-125 mg/ml) Aplicação passiva

FOTO	1ª LEITURA	2ª LEITURA	3ª LEITURA	ESCORE
1 minuto				
110939	6	7	7	7
110971	6	7	6	6
110973	8	8	8	8
110977	8	8	8	8
120971	7	7	8	7
2 minutos				
110931	6	6	6	6
110943	6	4	6	6
110957	8	8	6	8
120925	4	4	4	4
120929	4	4	6	4
3 minutos				
110115	4	6	4	4
120927	4	6	4	4
120941	4	4	6	4
120957	8	7	7	7
120965	3	3	3	3

Grupo VII (TTC HCl-125 mg/ml) Aplicação por fricção

FOTO	1ª LEITURA	2ª LEITURA	3ª LEITURA	ESCORE
1 minuto				
110913	5	2	5	5
110927	2	2	2	2
110951	3	3	5	3
110997	3	5	5	5
261197	1	1	1	1
2 minutos				
110993	1	1	1	1
120945	2	2	3	2
120963	1	1	1	1
120967	5	5	5	5
261155	1	1	1	1
3 minutos				
110933	5	5	5	5
110937	5	5	5	5
110963	2	2	2	2
110979	5	5	5	5
110981	5	5	4	5

Grupo VII (TTC HCl-125 mg/ml) Aplicação por pincel

Foto	1ª LEITURA	2ª LEITURA	3ª LEITURA	ESCORE
1 minuto				
261105	5	5	5	5
261109	4	4	4	4
261193	2	2	2	2
281123	4	3	4	4
281151	1	3	3	3
2 minutos				
261125	5	5	5	5
261127	2	2	2	2
261149	3	3	2	3
281113	1	1	1	1
121235	4	4	5	4
3 minutos				
261119	1	1	1	1
261147	5	5	5	5
260109	1	1	1	1
260119	5	5	5	5
281103	1	1	1	1

Grupo VIII (TTC HCl-150 mg/ml) Aplicação passiva

Foto	1ª LEITURA	2ª LEITURA	3ª LEITURA	ESCORE
1 minuto				
110901	6	7	6	6
110907	6	6	6	6
110925	7	8	7	7
110985	4	4	4	4
110999	6	6	6	6
2 minutos				
110935	4	4	6	4
110947	3	3	3	3
110959	6	6	7	6
110967	7	7	7	7
110983	4	6	6	6
3 minutos				
110949	3	3	2	3
110969	4	4	4	4
110107	6	4	6	6
120951	8	8	8	8
120969	4	4	3	4

Grupo VIII (TTC HCl-150 mg/ml) Aplicação por fricção

Foto	1ª LEITURA	2ª LEITURA	3ª LEITURA	ESCORE
1 minuto				
110103	1	1	1	1
120921	3	3	3	3
120935	5	5	5	5
120953	5	5	5	5
120959	1	1	1	1
2 minutos				
110903	1	1	1	1
110905	3	2	3	3
110909	5	5	5	5
110911	3	5	5	5
110919	1	2	2	2
3 minutos				
110991	1	1	1	1
110113	5	5	5	5
120943	5	5	5	5
120961	5	5	5	5
120975	5	5	5	5

Grupo VIII (TTC HCl- 150 mg/ml) Aplicação por pincel

Foto	1ª LEITURA	2ª LEITURA	3ª LEITURA	ESCORE
1 minuto				
261103	2	3	2	2
261151	4	4	4	4
261195	6	6	6	6
260113	6	6	6	6
281127	2	2	2	2
2 minutos				
281165	6	6	6	6
281177	2	2	3	2
281189	3	3	2	3
281191	2	2	2	2
281193	3	3	3	3
3 minutos				
281153	1	1	1	1
281167	1	1	1	1
281179	3	3	3	3
281185	1	1	1	1
281187	3	3	4	3

Grupo IX (TTC HCl-200 mg/ml) Aplicação passiva

FOTO	1ª LEITURA	2ª LEITURA	3ª LEITURA	ESCORE
1 minuto				
261111	7	7	7	7
261175	7	7	7	7
261177	1	1	1	1
261107	7	7	7	7
281129	8	8	8	8
2 minutos				
261169	7	7	7	7
260103	4	4	6	4
281145	3	3	3	3
281175	8	8	8	8
281101	4	4	4	4
3 minutos				
261137	4	3	4	4
261173	4	4	4	4
261101	4	4	4	4
281135	8	8	8	8
281171	7	7	7	7

Grupo IX (TTC HCl-200 mg/ml) Aplicação por fricção

FOTO	1ª LEITURA	2ª LEITURA	3ª LEITURA	ESCORE
1 minuto				
261117	3	3	3	3
261121	3	3	3	3
261153	5	5	5	5
261171	5	5	5	5
281173	1	1	1	1
2 minutos				
261165	4	5	5	5
261181	4	4	4	4
281169	4	4	4	4
281105	1	1	1	1
121263	5	5	5	5
3 minutos				
261135	5	5	5	5
261159	1	1	1	1
261183	5	5	5	5
281117	5	5	5	5
281155	5	5	5	5

Grupo IX (TTC HCl-200 mg/ml) Aplicação por pincel

Foto	1ª LEITURA	2ª LEITURA	3ª LEITURA	ESCORE
1 minuto				
121217	5	5	5	5
121219	5	5	5	5
121223	5	5	5	5
121247	5	5	5	5
121251	5	5	5	5
2 minutos				
121203	1	1	1	1
121213	1	1	1	1
121221	5	5	4	5
121241	5	5	5	5
121245	1	1	1	1
3 minutos				
121211	1	1	1	1
121227	6	4	6	6
121231	1	1	1	1
121239	1	1	1	1
121255	5	5	5	5

Grupo X (TTC HCl-250 mg/ml) Aplicação passiva

Foto	1ª LEITURA	2ª LEITURA	3ª LEITURA	ESCORE
1 minuto				
261129	8	8	8	8
261185	8	8	8	8
281125	8	8	8	8
281143	8	8	8	8
281159	7	7	7	7
2 minutos				
261133	8	8	8	8
261161	6	7	6	6
261191	7	7	7	7
260105	8	8	8	8
260115	6	6	6	6
3 minutos				
261113	8	8	8	8
261157	6	6	4	6
261167	3	3	3	3
260107	7	7	6	7
281157	6	6	4	6

Grupo X (TTC HCl-250 mg/ml) Aplicação por fricção

FOTO	1ª LEITURA	2ª LEITURA	3ª LEITURA	ESCORE
1 minuto				
261131	5	5	5	5
261163	5	5	5	5
261189	2	2	2	2
281119	5	5	5	5
281147	2	2	2	2
2 minutos				
261187	5	5	5	5
260111	5	5	5	5
281111	5	5	5	5
281115	5	5	5	5
291139	3	5	5	5
3 minutos				
261123	5	3	5	5
261199	5	5	5	5
281131	5	3	5	5
281137	5	5	4	5
281149	5	5	5	5

Grupo X (TTC HCl-250 mg/ml) Aplicação por pincel

FOTO	1ª LEITURA	2ª LEITURA	3ª LEITURA	ESCORE
1 minuto				
121201	4	3	4	4
121205	1	1	1	1
121233	1	1	1	1
121243	4	4	3	4
121253	3	2	3	3
2 minutos				
121207	1	1	1	1
121229	1	1	1	1
121237	1	1	1	1
121257	2	3	2	2
121261	5	5	5	5
3 minutos				
121209	1	1	1	1
121215	1	1	1	1
121225	1	1	1	1
121249	5	5	5	5
121259	1	1	1	1

ANEXO 3

Anexo 3

Os dados utilizados para o cálculo do kappa ponderado foram os 50 escores (aproximadamente 10% do total de 450) atribuídos às amostras do grupo de 2 minutos. Esse grupo foi escolhido para avaliar a reprodutibilidade intra-examinador porque apresentou amostras as quais receberam praticamente todos os 8 escores. Somente o escore 6 não ocorreu nesse grupo.

Tabela de contingência dos escores atribuídos às fotomicrografias

		Primeira leitura								
		1	2	3	4	5	6	7	8	Soma
Segunda Leitura	1	14	1							15.00
	2		2	3						5.00
	3		2	2		2				6.00
	4			1	4	1				6.00
	5					11				11.00
	6				2					2.00
	7							3		3.00
	8								2	2.00
Soma		14.00	5.00	6.00	6.00	14.00	0.00	3.00	2.00	50.00

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

Araraquara, 11 de dezembro de 2007.

EDUARDO DE PAULA ISHI

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)