

FRANCISCO WANDERLEY GARCIA DE PAULA E SILVA

**MÉTODOS DE AVALIAÇÃO E MECANISMOS ENVOLVIDOS NO REPARO APICAL E PERIAPICAL APÓS TRATAMENTO  
ENDODÔNTICO EM DENTES COM LESÃO INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de  
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para  
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Odontopediatria

Orientadora: Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva

Co-orientadora: Profa. Dra. Yvonne Lorraine Kapila

Ribeirão Preto

2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

## AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

Autorizo a reprodução e / ou divulgação total ou parcial da presente obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Francisco Wanderley Garcia de Paula e

Métodos de avaliação e mecanismos envolvidos no reparo apical e periapical após tratamento endodôntico em dentes com lesão induzida experimentalmente. Ribeirão Preto, 2009.

167 p. : il.; 30 cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientadora: Silva, Léa Assed Bezerra da

Co-orientadora: Kapila, Yvonne Lorraine

1. Lesão periapical
2. Tratamento endodôntico
3. Exame radiográfico
4. Tomografia computadorizada de feixe cônico
5. Hidróxido de cálcio
6. Metaloproteinases da matriz
7. Ligamento periodontal
8. Cementogênese

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Silva FWGP. **Métodos de avaliação e mecanismos envolvidos no reparo apical e periapical após tratamento endodôntico em dentes com lesão induzida experimentalmente.** Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Odontopediatria.

Data da defesa: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

**FRANCISCO WANDERLEY GARCIA DE PAULA E SILVA**

- ascimento** 28 de março de 1982, Itamogi, MG
- Filiação** Francisco Wanderley de Paula e Silva  
Maria Angélica Garcia de Paula e Silva
- 2000-2003** Graduação em Odontologia  
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo  
Iniciação científica: Avaliação do perfil de sensibilidade de *Streptococcus mutans*, isolados de crianças e adolescentes asmáticos, frente a anti-sépticos orais.  
Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Monteiro de Souza-Gugelmin
- 2004-2005** Aperfeiçoamento no Atendimento Odontológico a Pacientes Especiais  
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
- 2004-2006** Mestrado em Odontopediatria  
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo  
Dissertação: Resposta pulpar e periapical em dentes de cães após pulpotomia e utilização da proteína óssea morfogenética (rhBMP-7).  
Estudo histopatológico e radiográfico.  
Orientadora: Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva  
Bolsa: FAPESP (2004/05092-1)
- 2006-2009** Doutorado em Ciências  
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo  
Tese: Métodos de avaliação e mecanismos envolvidos no reparo apical e periapical pós-tratamento endodôntico em dentes com lesão induzida experimentalmente.  
Orientadora: Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva  
Co-orientadora: Profa. Dra. Yvonne Lorraine Kapila  
Bolsa: FAPESP (2006/51161-0)
- 2007-2008** Programa de Doutorado com Estágio no Exterior  
Mesenchymal biology and signaling laboratory  
University of Michigan, School of Dentistry, Ann Arbor, MI, EUA  
Bolsa: CAPES / PDEE (0668/07-9)

Trabalho realizado no Laboratório de Histologia e Microscopia do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, sob a orientação da Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva, com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – **FAPESP** (processos 2006/59072-7 e 2006/51161-0) e no *Mesenchymal Biology and Signaling Laboratory* do Departamento de *Periodontics and Oral Medicine* na *University of Michigan, School of Dentistry*, sob orientação da Profa. Dra. Yvonne Lorraine Kapila, com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – **CAPES** (processo 0668/07-9) e do *National Institutes of Health* – **NIH** (processos RO1-DE13725 e RO1-DE16671).

## DEDICO ESTE TRABALHO

Aos meus pais **Francisco Wanderley de Paula e Silva** e **Maria Angélica Garcia de Paula e Silva**, pelo apoio incondicional, mesmo que não pareça apoio à primeira vista. Novamente devo agradecer por vocês compreenderem os motivos da minha constante ausência. E como tem sido constante... Obrigado pela dedicação e carinho, pelos esforços. Agradeço pela capacidade que vocês sempre tiveram de enxergar com tanta antecipação quais seriam as minhas necessidades quando eu me tornasse “gente grande”. Serei eternamente grato.

À minha irmã **Livia Cristina Arcipreti de Paula e Silva**, por toda amizade, sempre! Pelas nossas conversas em silêncio, pela sua incrível capacidade de compreender e aceitar as coisas como elas são. Isso é sinal de grande inteligência...

À **Maya Fernanda Manfrin Arnez**, pelo carinho e companheirismo. Algumas pessoas são especiais. Elas são colocadas na nossa vida para preencher um vazio que nós mesmos não conseguimos compreender o que é. Você é uma destas pessoas! Obrigado por acreditar em mim, pelo apoio constante, pela paciência. Admiro muito você. Obrigado por ser a força que muitas vezes me falta!

Ao **Gonzalo Fernando Arnez Taboada, Marlene A. Manfrin Arnez, Mayara Manfrin Arnez** e **Marck F. Manfrin Arnez**.  
Pela acolhida sempre animada e calorosa.

A todos os membros das famílias **Garcia, Arcipreti** e **Paula e Silva**. Pelos incentivos, por vibrarem comigo a cada conquista. Muito obrigado! Aos amigos **Humberto Matheus Garcia Arcipreti Gomes, Marisa Garcia Arcipreti Gomes** e **Ana Carolina Soares Vicente**. Pelo sorriso verdadeiro...

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

À **Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**, pela orientação segura no desenvolvimento deste trabalho e de tantos outros. Por me mostrar o mundo de verdade. Formar recursos humanos não é uma tarefa simples e a senhora tem a habilidade de mostrar que existem muitos caminhos... mas que é sempre importante caminhar com um objetivo claro e definido. Obrigado por acreditar na minha capacidade, por permitir o desenvolvimento deste trabalho, por ter me recebido como aluno. Pelos ensinamentos, por guiar meus passos, pela participação direta neste trabalho. E pelo apoio, inúmeras vezes. Muito obrigado!

À **Profa. Dra. Yvonne Lorraine Kapila**, por ter me recebido no seu laboratório com apenas “uma idéia”, mas claramente sem capacidade para executá-la. Por acreditar que eu seria capaz de obter algum resultado! E contar uma estória com ele... Por me ensinar que a persistência é a característica que um pesquisador deve cultivar diariamente. Por ser tão gentil e atenciosa. Por ter me recebido para fazer parte da sua equipe. Muito obrigado!

Aos **Professores Prof. Dr. Paulo Nelson Filho** e **Profa. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz**, por me ensinarem tudo: atender pacientes na clínica, escrever artigos... Por me mostrarem, ainda desde a graduação, a importância da Odontopediatria.

## **MEUS AGRADECIMENTOS**

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do atual Diretor **Prof. Dr. Osvaldo Luiz Bezzon** e do Vice-Diretor **Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros** e à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da **Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**.



Ao **Prof. Dr. Mário Roberto Leonardo**, pelas importantes contribuições científicas, pela atenção e disponibilidade durante a realização deste trabalho.

Aos Professores **Profa. Dra. Kranya Victória Díaz Serrano, Profa. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuani, Profa. Dra. Maria da Conceição Pereira Saraiva e Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco**, pelo despretencioso apoio oferecido, pelas conversas agradáveis, por me mostrarem que existia um mundo diferente além da minha visão limitada.

Aos demais Professores do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Profa. Dra. Sada Assed, Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto, Profa. Dra. Aldevina Campos Freitas, Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra da Silva, Profa. Dra. Mirian Aiko Nakane Matsumoto, Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira e Prof. Dr. Adílson Thomazinho**, pela agradável convivência e valiosos ensinamentos durante minha formação acadêmica e científica.

À **Adriana Sasso Stuani**, pela disponibilidade, pelas discussões proveitas e pelas dúvidas compartilhadas. Espero que algum dia eu consiga retribuir toda ajuda que recebi!

Aos grandes mestres da bancada **Abhijit Ghosh, Nam Eok Joo, Pachiyappan Kamarajan, Wei Wang, Raj Mitra e Takayuki Hayami**, pela incrível paciência e pelos inúmeros questionamentos que permitiram que eu caminhasse pra frente... Aos amigos do laboratório **Ji Young Park, Sindhu Halubai, Turki Alhazzazi, Jinping Xu, Jeena Joseph, Nika Grigaitis e Suresh Patel** pela disponibilidade, pela atenção, pelas conversas. Fico muito feliz por ter feito parte deste time!!!

Aos colaboradores **Dr. Sunil Kapila, Dr. Nisha D'Silva, Dr. Higinio Arzate, Dr. Min-Kai Wu, Dr. Paul Wesselink, Dr. Bassam Hassan, Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli, Dr. Carlos Arterio Sorgi, Prof. Dr. Alberto Consolaro, Prof. Dr. Daniel Silva Herzog Flores e Dr. Milton Santamaria-Junior**, pela cordialidade, pelos ensinamentos, pelos questionamentos e pela cooperação durante a realização desta pesquisa.

Aos Pós-Graduandos **Valéria Pontelli Navarro Tedeschi, Soraia Monique Fiorati Aguiar, Olívia Santos de Oliveira Verardo, Sara Elisa Medina Mattar, Vanessa Bernardini Maldonado, Talitha de Siqueira Mellara e Ana Paula Ramos Bernardes da Silva**, pelas conversas, pela convivência agradável. Aos demais Pós-Graduandos do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria. Foi um privilégio compartilhar meu tempo com vocês!

Ao **Marco Antônio dos Santos**, à **Fátima Jacinto Daniel** e à **Nilza Letícia Magalhães**, por toda a ajuda e disponibilidade na realização do processamento histológico, não só deste trabalho, mas sempre!

Aos demais funcionários e ex-funcionários do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Filomena Lelli Placciti**, **Micheli Cristina Leite Rovanholo**, **Nilva Aparecida Afonso Ruggiero** e **Rejane Gomes Cavalheiro Mazzer** e aos funcionários do Centro de Formação de Recursos Humanos no Atendimento Odontológico a Pacientes Especiais, **Carolina Paes Torres Mantovani**, **Fátima Rizóli**, **Gisele Faria**, **Nadir das Dores Gardin** e **Renata Aparecida Fernandes Rodrigues**, pela amizade e atenção que sempre manifestaram.

Ao **Sr. Edson Luis Mori**, **Aldo Dias Feiteiro Junior** e **Edson Campos Rodrigues**, pela colaboração no cuidado com os animais e pelo valioso auxílio.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Isabel Cristina Galino Sola** e **Regiane Cristina Moi Sacilotto**, pela cordialidade e atenção.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**, pelo suporte científico e financeiro fundamentais para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Silva FWGP. **Métodos de avaliação e mecanismos envolvidos no reparo apical e periapical após tratamento endodôntico em dentes com lesão induzida experimentalmente** [tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2009.

Considerando-se a localização intra-óssea das lesões periapicais, o diagnóstico clínico é dificultado e a avaliação radiográfica não fornece informações suficientes para o diagnóstico de um periodonto apical sadio pós-tratamento. Dessa maneira, o objetivo deste estudo foi comparar os achados radiográficos e por tomografia computadorizada de feixe cônico com a avaliação microscópica após tratamento de canais radiculares em dentes de cães e avaliar a participação das metaloproteinases da matriz (MMPs) na lesão periapical e nos tecidos em processo de reparação, assim como em cistos e granulomas periapicais obtidos de humanos. A seguir, os mecanismos envolvidos na cementogênese apical foram investigados utilizando células do ligamento periodontal de humanos. Foram induzidas lesões periapicais em dentes de cães e o tratamento endodôntico foi realizado em sessão única ou após utilização de um curativo de demora à base de hidróxido de cálcio [Ca(OH)<sub>2</sub>]. Avaliações radiográficas e tomográficas foram realizadas previamente, após a indução das lesões periapicais e 180 dias após o tratamento endodôntico. Os tecidos periapicais foram avaliados por meio de microscopia de luz, imunofluorescência, imunistoquímica e RT-PCR em tempo real. *In vitro*, células do ligamento periodontal foram utilizadas para avaliar os efeitos da estimulação com Ca(OH)<sub>2</sub> nos processos de migração, proliferação, diferenciação celular e mineralização. As vias de sinalização envolvidas na diferenciação cementoblástica foram investigadas por meio de inibidores bioquímicos da via das proteínas quinases ativadoras de mitose (MAPK), bloqueadores de canais de cálcio e silenciadores de RNA para proteínas quinases reguladas por sinal extracelular (ERK-1 / ERK-2). De acordo com os resultados obtidos, a tomografia computadorizada permitiu a detecção de lesões periapicais com maior sensibilidade e acurácia que a radiografia periapical convencional, utilizando-se a avaliação microscópica como padrão-ouro. Histologicamente, as lesões periapicais experimentalmente induzidas apresentaram bactérias distribuídas pelo sistema de canais radiculares e lacunas de reabsorção do cimento e estavam associadas à desorganização das fibras colágenas e alta expressão de MMPs. A presença das MMPs em processos inflamatórios periapicais de humanos (cistos e granulomas) foi confirmada. Nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única o desfecho do tratamento endodôntico foi caracterizado pela manutenção ou progressão da lesão periapical e alta expressão de MMPs. Por outro lado, nos dentes submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o Ca(OH)<sub>2</sub> como curativo de demora, maior número de espécimes apresentaram regressão da lesão periapical e houve modulação da expressão de MMPs pelo tratamento. Neste grupo foi evidenciada neoformação de cimento no forame apical. Células do ligamento periodontal estimuladas com Ca(OH)<sub>2</sub> expressaram proteínas específicas de cementoblastos (CEMP-1, CAP) e foram capazes de sintetizar nódulos de mineralização, mediados via ERK MAPK. A ação do Ca(OH)<sub>2</sub> ocorreu via canais de cálcio, uma vez que o bloqueio destes canais inibiu a fosforilação de ERK-1 e ERK-2 e, portanto, a expressão de CEMP-1 e CAP. CEMP-1 estimulou a migração, proliferação e mineralização mediada por células, exercendo um papel central na cementogênese, uma vez que o bloqueio de CEMP-1 inibiu a migração celular e mineralização. Juntos, estes resultados permitem concluir que a tomografia computadorizada é superior à radiografia periapical convencional para detecção de lesões periapicais refratárias ao tratamento de canais radiculares. Ainda, o tratamento endodôntico realizado utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora propiciou um reparo apical e periapical mais favorável do que o tratamento endodôntico em sessão única, possivelmente devido a capacidade do Ca(OH)<sub>2</sub> induzir a diferenciação de células do ligamento em células com um fenótipo cementoblástico e posterior mineralização.

**Palavras-chave:** Lesão periapical, Tratamento endodôntico, Tomografia computadorizada de feixe cônico, Exame radiográfico, Metaloproteinases da matriz, Hidróxido de cálcio, Ligamento periodontal, Cementogênese.

## ABSTRACT

Silva FWGP. **Methods of evaluation and mechanisms involved in apical and periapical repair following root canal treatment in teeth with experimentally-induced apical periodontitis** [thesis]. Ribeirão Preto: School of Dentistry of Ribeirão Preto at University of São Paulo; 2009.

Clinical diagnosis of apical periodontitis is difficult due to the intraosseous nature of the disease and radiographic evaluation does not provide sufficient information to determine a healthy apical periodontium following root canal therapy. Therefore, the aim of this study was to compare the radiographic and cone beam computed tomographic findings with microscopic evaluation following root canal treatment in dogs' teeth. Then, the presence of matrix metalloproteinases (MMPs) in apical periodontitis and during the healing phase following treatment was evaluated and compared to the expression of MMPs in periapical cysts and granulomas obtained from human. Finally, the mechanisms involved in apical cementogenesis were investigated using human periodontal ligament cells. Apical periodontitis was induced in dogs' teeth and then root canal treatment was performed in a single visit or using calcium hydroxide [Ca(OH)<sub>2</sub>] as the root canal dressing. Tomographic and radiographic evaluations were performed prior to and following induction of apical periodontitis, and 180 days following root canal therapy. Periapical tissues were evaluated by conventional light microscopy, immunofluorescence, immunohistochemistry, and real time RT-PCR. *In vitro*, periodontal ligament cells were used to evaluate the effects of Ca(OH)<sub>2</sub> treatment on cell migration, proliferation, differentiation, and mineralization. The signaling pathways triggered by treatment with Ca(OH)<sub>2</sub> were investigated using mitogen activated protein kinase (MAPK) biochemical inhibitors, calcium channel blockers, and extracellular regulated protein kinase (ERK-1 / ERK-2) silencing RNAs. Based on the results obtained, apical periodontitis was detected with higher sensitivity and accuracy by means of cone beam computed tomography compared to conventional periapical radiographs, using microscopic evaluation as the gold standard. Histological evaluation revealed that teeth with apical periodontitis presented microorganisms throughout the root canal system and in areas with resorption of cementum. Apical periodontitis was characterized by collagen fiber disorganization and high expression of MMPs. The presence and activity of MMPs was confirmed in periapical inflammatory diseases (cysts and granulomas) obtained from humans. Root canal treatment outcome was characterized by maintenance or progression of apical periodontitis and high expression of MMPs in teeth submitted to root canal treatment in a single visit, whereas root canal treatment outcome in teeth submitted to root canal treatment using Ca(OH)<sub>2</sub> as the root canal dressing, higher number of teeth presented reduced apical periodontitis and lower expression of MMPs. In this group, cementum neogenesis was evident in the apical foramina. Periodontal ligament cells stimulated with Ca(OH)<sub>2</sub> expressed cementoblastic specific proteins (CEMP-1, CAP) and were able to synthesize mineralized nodules via ERK MAPK. The effects of Ca(OH)<sub>2</sub> occurred via calcium channels, since their blockade prevented ERK-1 and ERK-2 phosphorylation and therefore expression of CEMP-1 and CAP. CEMP-1 stimulated cell migration, proliferation, and mineralization and it was central to cementogenesis because blockade of activity of CEMP-1 prevented cell migration and mineralization. Taken together, these findings demonstrate that cone beam computed tomography is superior to conventional periapical radiography for detection of refractory apical periodontitis. Furthermore, the root canal treatment using Ca(OH)<sub>2</sub> as the root canal dressing permitted a more favorable outcome than the root canal treatment performed in a single visit, probably due to the ability of Ca(OH)<sub>2</sub> induce cementoblastic differentiation of periodontal ligament cells and mineralization.

**Key-words:** Apical periodontitis, Root canal treatment, Cone beam computed tomography, Radiographic evaluation, Matrix metalloproteinases, Calcium hydroxide, Periodontal ligament, Cementogenesis.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	INTRODUÇÃO .....	17
<b>2</b>	CAPÍTULO 1 .....	21
	Comparação entre a tomografia computadorizada de feixe cônico, o exame radiográfico periapical e a avaliação microscópica para detecção da lesão periapical experimentalmente induzida	
<b>3</b>	CAPÍTULO 2 .....	55
	Metaloproteinases da matriz foram altamente expressas em lesões periapicais de humanos e em lesões experimentalmente induzidas em cães. A utilização do hidróxido de cálcio como curativo de demora em dentes com lesão periapical propiciou um processo de reparo apical e periapical mais favorável do que o tratamento endodôntico em sessão única	
<b>4</b>	CAPÍTULO 3 .....	95
	O hidróxido de cálcio induz a diferenciação de células do ligamento periodontal em cementoblastos e promove mineralização via expressão da proteína do cimento-1 (CEMP-1) e de proteínas quinases reguladas por sinal extracelular (ERK-1 / ERK-2)	
<b>5</b>	CONCLUSÕES .....	139
	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	140
	REFERÊNCIAS .....	141
	APÊNDICE .....	165
	ANEXOS	

## INTRODUÇÃO

As lesões periapicais são patologias frequentes no complexo maxilofacial (Liapatas *et al.*, 2003; Ricucci *et al.*, 2006; Bueno e Estrela, 2008) e são resultantes da contaminação e necrose da polpa dental e progressão da infecção em direção ao ligamento periodontal e osso alveolar propriamente dito (Kakehashi *et al.*, 1965, Nair, 2004; Fabricius *et al.*, 2006). A interação do número de microrganismos presentes no interior dos canais radiculares, o grau de virulência destes microrganismos e a defesa orgânica do indivíduo determinam a ocorrência de tipos de alterações periapicais específicos, variando de abscessos a cistos e granulomas periapicais (Ørstavik e Pitt-Ford, 1998; Leonardo, 2008).

Independentemente se a manifestação da lesão periapical é aguda ou crônica, o fator etiológico primário de todas as formas da lesão é a contaminação microbiana dos canais radiculares (Kakehashi *et al.*, 1965; Nair *et al.*, 2005; Fabricius *et al.*, 2006). Dessa maneira, no tratamento da lesão periapical, é importante a remoção dos microrganismos que estimulam o desenvolvimento, a progressão e a manutenção da resposta imuno-inflamatória periapical, sendo o objetivo principal a eliminação da contaminação no sistema de canais radiculares (Carrotte, 2004a; Leonardo, 2008). Para esta finalidade são utilizados diferentes materiais, técnicas e instrumentos visando a limpeza físico-químico-mecânica desse sistema complexo (Carrotte, 2004b).

O tratamento endodôntico radical é a terapia de escolha para combater a lesão periapical. Entretanto, quando a assepsia do sistema de canais radiculares não é realizada adequadamente, a lesão periapical não é eliminada, ainda que não existam sinais e sintomas clínicos (Fabricius *et al.*, 2006; Estrela *et al.*, 2008c; Ricucci *et al.*, 2009). A taxa estimada de sucesso clínico-radiográfico do tratamento de canais radiculares convencional varia de 64 a 85% dos casos (Kojima *et al.*, 2004; Sathorn *et al.*, 2005; Ng *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2009), excluindo-se os casos de retratamento e cirurgias pararendodônticas associadas. Essa taxa de sucesso é menor nos dentes com lesão periapical visível radiograficamente comparado aos dentes com vitalidade pulpar (Kojima *et al.*, 2004; Ng *et al.*, 2008), indicando portanto que o tratamento endodôntico realizado em dentes com lesões periapicais deve ser reavaliado com a finalidade de se obter taxas de sucesso semelhantes aos dentes com vitalidade pulpar.

Embora a porcentagem de insucessos do tratamento de canais radiculares pareça baixa, quando convertido em número de tratamento sem sucesso numa população com extensão como a dos Estados Unidos<sup>1</sup>, estima-se que 54 a 117 milhões de tratamentos endodônticos realizados sejam mal-sucedidos (Fidgor, 2002). Nestes casos, a necessidade de retratamento gera um gasto desnecessário de 1,5 bilhões de dólares por ano (Spangberg, 2003). Ainda, a incerteza quanto ao prognóstico do tratamento endodôntico realizado em dentes com lesões periapicais tem levado os profissionais a optarem cada vez mais pela avulsão destes dentes e pela instalação de implantes ao invés de realizar o tratamento endodôntico (Zitzmann *et al.*, 2009).

O insucesso do tratamento de canais radiculares pode ser atribuído à incompleta assepsia dos canais radiculares durante a terapia endodôntica e persistência de microrganismos no interior dos canais radiculares ou nas lacunas de reabsorção na superfície externa da raiz (Leonardo *et al.*, 1994, 2002; Nair *et al.*, 2005; Fabricius *et al.*, 2006; Rocha *et al.*, 2008). Dentre os fatores técnicos responsáveis pela persistência da lesão periapical refratária ao tratamento endodôntico destacam-se o preparo inadequado da cavidade de acesso, a má instrumentação e obturação dos canais radiculares, principalmente a sobreinstrumentação e sobreobturação, a não remoção dos microrganismos ou seus produtos tóxicos nas áreas inacessíveis ao preparo biomecânico e a ocorrência de infiltração marginal devido à restauração deficiente do elemento dental (Ricucci e Langeland, 1998; Chugal *et al.*, 2003; Nair, 2004; Kirkevang *et al.*, 2007; Leonardo, 2008; Estrela *et al.*, 2008c; Hollanda *et al.*, 2008).

Atualmente existem dois protocolos clínicos mais utilizados para o tratamento endodôntico em dentes com lesão periapical visível radiograficamente: 1) a obturação dos canais radiculares em sessão única ou 2) a obturação após a utilização de um curativo de demora à base de hidróxido de cálcio. Os autores que preconizam a utilização do hidróxido de cálcio como curativo de demora acreditam que o hidróxido de cálcio é capaz de eliminar as bactérias remanescentes nos canais radiculares pós-instrumentação e nas áreas

---

<sup>1</sup> Tendo como base o estudo de Eriksen (1991) no qual foi estimado que um adulto apresenta em média 2,2 canais radiculares obturados.

inacessíveis ao preparo biomecânico (Sjögren *et al.*, 1991; Cheung, 2002), além de ser capaz de inativar o lipopolissacarídeo bacteriano (Safavi e Nichols, 1993), importante agente estimulador da reabsorção óssea periapical (Nelson-Filho *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2008a).

Estudos experimentais realizados em modelos animais têm demonstrado, por meio de avaliação microscópica, que o processo de reparação apical e periapical é mais avançado quando se utiliza o curativo de demora em comparação ao tratamento endodôntico em sessão única (Leonardo *et al.*, 1994; Katebzadeh *et al.*, 1999; Holland *et al.*, 2003; De-Rossi *et al.*, 2005; Leonardo *et al.*, 2006; Silveira *et al.*, 2007). Por outro lado, em *clinical trials*, esta diferença ainda não foi observada (Trope *et al.*, 1999; Weiger *et al.*, 2000; Peters e Wesselink, 2002; Figini *et al.*, 2007; Naito *et al.*, 2008), possivelmente em função das limitações de delineamento das pesquisas clínicas, principalmente com relação ao tamanho da amostra e aos métodos utilizados para diagnóstico e mensuração das lesões periapicais.

Uma crítica em relação a estes estudos prévios é a utilização de radiografias periapicais convencionais para determinação do sucesso pós-tratamento de canais radiculares, as quais apresentam baixa sensibilidade para diagnóstico de lesões periapicais (Bender e Seltzer, 1961; Bender, 1982; Brynolf, 1967; Katebzadeh *et al.*, 1999, 2000; Barthel *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2006; Stravopoulos e Wenzel, 2007; Estrela *et al.*, 2008b; Wu *et al.*, 2009). Considerando que as lesões periapicais podem estar confinadas ao tecido ósseo esponjoso e portanto não serem detectadas pela radiografia periapical convencional (Huomonen e Ørstavik, 2002; Ricucci e Bergenholtz, 2003), a prevalência destas lesões na população pode estar sendo subestimada pelo exame radiográfico. Embora a avaliação microscópica seja o padrão-ouro para determinar a presença ou não de inflamação periapical, a mesma não é realizada rotineiramente em humanos, devido à necessidade de realização de um procedimento cirúrgico adicional. Neste sentido, a busca por métodos de imaginologia mais acurados e que possam representar mais fielmente a característica histológica apical pós-tratamento de canais radiculares é necessária (Patel e Horner, 2009). A partir disto, novas taxas de sucesso poderão ser estimadas com maior sensibilidade e especificidade.



Diante do exposto, esta pesquisa teve como objetivo comparar os achados radiográficos e tomográficos com a avaliação microscópica, considerada o padrão-ouro para detecção de lesões periapicais, com a finalidade de estabelecer qual dentre as duas técnicas é a mais fiel e, portanto, poderia apresentar maior segurança no acompanhamento da regressão da lesão periapical após tratamento de canais radiculares (Capítulo 1). A seguir, a participação das metaloproteinases da matriz na lesão periapical e nos tecidos em processo de reparação pós-tratamento de canais radiculares foi investigada (Capítulo 2). Finalmente, os mecanismos e moléculas envolvidos na cementogênese apical detectada *in vivo*, pós-tratamento de canais radiculares, foram investigados utilizando células do ligamento periodontal de humanos (Capítulo 3).

## **CAPÍTULO 1. COMPARAÇÃO ENTRE A TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA DE FEIXE CÔNICO, O EXAME RADIOGRÁFICO PERIAPICAL E A AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA PARA DETECÇÃO DA LESÃO PERIAPICAL EXPERIMENTALMENTE INDUZIDA**

A radioluscência periapical é o principal sinal indicativo da presença da lesão periapical e a tomada de radiografias periapicais, convencionais ou digitais, é o principal método auxiliar utilizado para diagnóstico bem como para acompanhamento da regressão ou não da lesão periapical após tratamento de canais radiculares (Leonardo, 2008). Clinicamente, o sucesso após o tratamento endodôntico é determinado quando os sinais clínicos desaparecem, embora, na maior parte dos casos a lesão periapical seja assintomática (Fristad *et al.*, 2004; Mead *et al.*, 2005) e assim o sucesso do tratamento é determinado quase que exclusivamente com base nos achados radiográficos (Ng *et al.*, 2007).

Para acompanhamento da involução da lesão periapical pós-tratamento é aceito que são necessários pelo menos 4 anos para o completo desaparecimento da lesão periapical avaliada pelo exame radiográfico (Ørstavik *et al.*, 1987; Ørstavik e Pitt-Ford, 1998; European Society of Endodontology, 2006; Leonardo, 2008). Entretanto, os achados radiográficos em dentes com lesão periapical não representam a condição observada clinicamente (Bender e Seltzer, 1961; Bender, 1982) ou microscopicamente (Brynolf, 1967; Barthel *et al.*, 2004), indicando que, em muitos casos, a lesão periapical pode persistir por muitos anos após tratamento de canais radiculares, mesmo na ausência de sinais e sintomas clínico-radiográficos (Katebzadeh *et al.*, 1999, 2000).

Em estudo realizado em cadáveres de humanos, no qual foi identificado um periodonto apical normal pelo exame radiográfico, em apenas 53% a 67% dos casos não foram detectadas lesões periapicais microscopicamente (Brynolf, 1967; Barthel *et al.*, 2004). Essas divergências ocorrem porque as radiografias fornecem imagens bidimensionais de uma estrutura tridimensional, impedindo que lesões periapicais confinadas ao osso esponjoso sejam detectadas, principalmente em áreas que apresentam uma cortical óssea mais espessa (Huomonen e Ørstavik, 2002; Bender e Seltzer, 1961; Bender, 1982; van der Stelt, 1985; Stabholz *et al.*, 1994; Ricucci e Bergenholtz, 2003; Wu *et al.*, 2006). Ainda, as radiografias periapicais fornecem imagens do elemento dental no plano sagital (orientação méso-distal) e a tomada radiográfica coronal não pode ser realizada, limitando portanto a avaliação da extensão vestibulo-lingual das lesões periapicais e a determinação do grau de reabsorção do tecido ósseo cortical (Schwarz *et al.*, 1987; von Stechow *et al.*, 2003).

Considerando estas limitações da avaliação radiográfica, é possível especular que o

desfecho do tratamento de canais radiculares em dentes com lesão periapical pode ter sido subestimado nos estudos clínicos prévios com relação à persistência da lesão periapical refratária ao tratamento (Wu *et al.*, 2006; Estrela *et al.*, 2008b; Wu *et al.*, 2009). Dessa maneira, parece oportuno que novos métodos de imagiologia sejam investigados com o objetivo de permitir que a avaliação clínica seja a mais próxima possível da resposta histológica dos tecidos.

A tomografia computadorizada têm sido amplamente utilizada na Medicina desde 1970 (Brenner e Hall, 2007) e foi gradualmente introduzida na Odontologia, mais especificamente na Endodontia, a partir de 1989 (Trope *et al.*, 1989; Cotton *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 2007; Patel, 2009). Porém, somente nos últimos anos essa tecnologia tem sido amplamente difundida na Endodontia (Aggarwal *et al.*, 2008) e a partir daí, a acurácia da tomografia computadorizada para a detecção de lesões periapicais em humanos (Estrela *et al.*, 2008b) ou lesões periapicais artificialmente criadas (Stavropoulos e Wenzel, 2007) foi calculada. A relevância da utilização da tomografia computadorizada se deve ao fato de que em estudos prévios a radiolusência periapical identificada pela tomografia computadorizada não havia sido detectada pelo exame radiográfico periapical (Estrela *et al.*, 2008b; Lofthag-Hansen *et al.*, 2007; Jorge *et al.*, 2008; Vandenberghe *et al.*, 2008). Recentemente foi desenvolvida a Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico que consiste em expor um objeto a múltiplos feixes de radiação de formato cônico e consequente obtenção volumétrica da imagem do objeto. Posteriormente, são realizadas secções seriadas do objeto, permitindo que o cirurgião-dentista investigue, por meio da avaliação tridimensional, a morfologia dos tecidos bem como suas alterações patológicas (Mahesh, 2002; Lascaia *et al.*, 2004; Cotton *et al.*, 2007). A partir desta análise é possível estabelecer a relação das estruturas dentais com os diferentes extratos ósseos, com o seio maxilar e com o canal mandibular, permitindo o adequado planejamento para intervenções assim como para o acompanhamento do tratamento realizado (Williams *et al.*, 1992; Rhodes *et al.*, 1999; von Stechow *et al.*, 2003; Velvart *et al.*, 2001; Schulze *et al.*, 2006; Nakata *et al.*, 2006; Simon *et al.*, 2006; Estrela *et al.*, 2008a, 2008b).

A investigação experimental de métodos de imagiologia com alta sensibilidade e especificidade para o acompanhamento da regressão das lesões periapicais após tratamento endodôntico apresenta uma aplicação clínica direta para avaliar se os medicamentos comumente utilizados na clínica odontológica permitem a adequada reparação tecidual. Neste estudo os canais radiculares de dentes de cães portadores ou não de lesão periapical experimentalmente induzida foram submetidos ao tratamento endodôntico utilizando diferentes protocolos clínicos e o desfecho do tratamento endodôntico foi avaliado por meio

de tomografia computadorizada de feixe cônico, por radiografias periapicais convencionais e pela avaliação histológica dos tecidos. O objetivo específico desta pesquisa foi comparar os achados radiográficos e tomográficos com a avaliação microscópica, considerada o padrão-ouro para detecção de lesões periapicais (Laux *et al.*, 2000) com a finalidade de estabelecer qual dentre as duas técnicas é a mais fiel e, portanto, poderia apresentar maior segurança no acompanhamento da regressão da lesão periapical após tratamento de canais radiculares. Assim, foram calculados a sensibilidade, a especificidade e os valores preditivos negativo e positivo para cada uma das técnicas de imagiologia e a partir daí foi estabelecido o grau de acurácia para a tomografia computadorizada de feixe cônico e para o exame radiográfico periapical no acompanhamento clínico pós-tratamento endodôntico.

## **MATERIAL E MÉTODO**

### **Animais**

Após aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de São Paulo – Campus de Ribeirão Preto, processo nº 2007.1.192.53.6 (Anexo A), foram selecionados 15 cães machos, sem raça definida, com 12 meses de idade e pesando, em média 15 quilogramas. Os animais receberam vermífugos (Drontal<sup>®</sup> Puppy; Bayer, São Paulo, SP) e vitaminas (Glicopan<sup>®</sup> Pet; Vetnil Indústria e Comércio de Produtos Veterinários Ltda, Louveira, SP), foram aplicadas vacinas anti-rábica (Rai-Vac I<sup>®</sup>; Fort Dodge, Campinas, SP) e quádrupla (Vanguard<sup>®</sup> HTLP 5/CV-L; Laboratórios Pfizer Ltda., Guarulhos, SP), em 3 doses, com 3 semanas de intervalo entre cada aplicação. Os cães foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com livre acesso à água e dieta padrão da Unidade durante todo o período de experimentação, sendo realizados exames de sangue (hemograma, TGP - Transaminase glutâmico pirúvica e fosfatase alcalina) para assegurar o estado de saúde dos animais durante todo o período de experimentação (Apêndice A).

### **Procedimentos operatórios**

O presente estudo foi realizado de acordo com as normas da International Organization for Standardization (ISO) nº 7405:1997. Foram utilizados os 3<sup>os</sup> e 4<sup>os</sup> premolares inferiores direito e esquerdo de cada animal, num total de 60 dentes (120 raízes), distribuídos em 5 grupos de acordo com o tratamento realizado (Tabela 1.1).

**Tabela 1.1.** Grupos experimentais estratificados de acordo com tratamento realizado e número de dentes por grupo

<b>Grupo</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Número dentes / raízes</b>
<b>1</b>	Tratamento endodôntico em dentes com vitalidade pulpar	12 / 24
<b>2</b>	Tratamento endodôntico em dentes com lesão periapical experimentalmente induzida em sessão única	12 / 24
<b>3</b>	Tratamento endodôntico em dentes com lesão periapical experimentalmente induzida utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora	12 / 24
<b>4</b>	Indução de lesão periapical sem tratamento endodôntico (controle positivo)	12 / 24
<b>5</b>	Dentes com vitalidade pulpar sem tratamento endodôntico (controle negativo)	12 / 24

Inicialmente os animais foram pré-anestesiados, por meio de injeção intramuscular de Rompum<sup>®</sup> (Cloridrato de Dihidrotiazina; Bayer S/A Produtos Veterinários, São Paulo, SP) na dosagem de 3,0 mg / Kg de peso, 30 minutos antes do ato operatório. A seguir, por via endovenosa, foi efetuada a anestesia geral com Thionembutal<sup>®</sup> (Tiopental Sódico; Abbot Laboratórios do Brasil Ltda., Rio de Janeiro, RJ), na dosagem de 30 mg / Kg de peso e, quando necessário, foi realizada a suplementação anestésica. Durante todo o ato operatório, os animais foram mantidos com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% com 2,5% de glicose (Glicolabor Indústria Farmacêutica Ltda., Ribeirão Preto, SP).

Todo o instrumental utilizado nos procedimentos operatórios foi esterilizado em autoclave a 121°C, por 20 minutos (Souza-Gugelmin *et al.*, 2005). A profilaxia dental foi realizada com o objetivo de remover cálculo e biofilme, seguida pela anestesia infiltrativa complementar com Mepivacaína a 2% com Noradrenalina 1:100.000 (Scandicaine<sup>®</sup>; Septodont Distribuidora DFL Indústria e Comércio Ltda., Rio de Janeiro, RJ).

Foi realizado o isolamento do campo operatório com dique de borracha, e anti-sepsia com peróxido de hidrogênio a 3%, seguida pela aplicação de digluconato de clorexidina a 2,0%. A abertura coronária foi iniciada utilizando pontas esféricas diamantadas número 1015 (K.G. Sorensen; São Paulo, SP) montadas em caneta de alta rotação, refrigeradas a ar e água, sendo, a seguir, substituídas por pontas tronco-cônicas, de extremidade inativa n° 3082 (K.G. Sorensen), também movidas em alta rotação. Foram realizadas duas aberturas oclusais, uma mesial e outra distal, mantendo-se a ponte de esmalte vestibulo-lingual, com o objetivo de prevenir fraturas coronárias (Silva, 1987, 1989). A seguir, foi realizada a remoção da polpa coronária com cureta, irrigação da câmara pulpar com solução de hipoclorito de sódio a 2,5% e a exploração do canal radicular com uma lima do tipo K n° 15 (Dentsply-Maillefer,

Ballaigues, Suíça), até identificar o platô apical presente em dentes de cães, localizado de 1 a 2 mm do ápice radicular. A presença da lima no interior do canal radicular foi confirmada pela radiografia periapical, tomada pela técnica de bissetriz, realizando-se a seguir, a odontometria para a obtenção do Comprimento Real do Dente (CRD) e consequente obtenção do Comprimento Real de Trabalho (CRT). A polpa radicular foi descolada e removida com uma lima tipo Hedströen (Dentsply-Maillefer), de tamanho compatível com o diâmetro do canal radicular.

A seguir, foi realizado o arrombamento do delta apical com limas tipo K (Dentsply-Maillefer) n<sup>os</sup> 15, 20, 25 e 30, utilizadas seqüencialmente, no CRD. No Grupo 1 foi realizado o preparo biomecânico, no CRT, situado radiograficamente a 1,5 mm aquém do CRD, por meio da técnica clássica de instrumentação (Leonardo e Leal, 2008), utilizando-se como solução irrigadora, 3,0 mL de solução de hipoclorito de sódio a 1,0%, a cada troca de instrumento.

Os canais radiculares foram ampliados, a partir do Instrumento Apical Inicial (I.A.I.) até a lima tipo K de n<sup>o</sup> 60, considerado como Instrumento Memória (I.M.). Após a utilização de cada instrumento, foi realizada uma copiosa irrigação / sucção / inundação dos canais radiculares. Terminado o preparo biomecânico, a lima tipo K n<sup>o</sup> 30 (I.A.F.) foi utilizada, em todo o CRD, para remoção de possíveis raspas de dentina e resíduos acumulados na região da abertura foraminal, em decorrência do preparo biomecânico. Após nova irrigação e sucção, os canais radiculares foram secos com pontas de papel absorvente esterilizadas (Dentsply Ind. Com. Ltda., Petrópolis, RJ) e, a seguir, inundados com solução de ácido etilenodiaminotetracético 14,3% tamponado em pH 7,4 (EDTA Trissódico; Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda., São Paulo, SP), agitado por três minutos com o instrumento de n<sup>o</sup> 30 (I.A.F.), no CRT. Após copiosa irrigação com soro fisiológico (Glicolabor Indústria Farmacêutica Ltda.) foi realizada a secagem dos canais radiculares por sucção complementada com pontas de papel absorvente, de calibre compatível com o diâmetro do último instrumento utilizado no CRT.

A obturação dos canais radiculares foi iniciada pela seleção do cone de guta-percha principal com base no diâmetro do último instrumento empregado no CRT durante o preparo biomecânico, confirmando-se a escolha clínica pelo exame radiográfico. Para a obturação dos canais radiculares foi utilizada a técnica de condensação lateral, sendo utilizado o cimento obturador AH Plus Jet Mix (Dentsply / De Trey; Konstanz, Germany), manipulado de acordo com as instruções do fabricante e levado ao interior do canal radicular envolvendo o cone de guta-percha principal com um único movimento. Foram utilizados cones de guta-percha auxiliares de tamanho XF (Dentsply Ind. Com. Ltda.), por meio da técnica da condensação lateral ativa com o auxílio de espaçador digital tamanho C

(Dentsply-Maillefer) de 21 mm de comprimento, até a obtenção da obturação completa do canal radicular. Após o corte, ao nível da entrada dos canais radiculares, e a condensação vertical do material obturador, as câmaras pulpares foram limpas com mechas de algodão esterilizadas, umedecidas em álcool, e os dentes restaurados com amálgama de prata (Velvalloy, S.S.White Art. Dent. Ltda., Rio de Janeiro, RJ) condensado sobre uma base de cimento de ionômero de vidro (Vitremmer; 3M/ESPE, St. Paul, EUA).

Para os Grupos 2 e 3 foram seguidos os mesmos passos operatórios descritos no Grupo 1, até a remoção da polpa radicular. A seguir, os canais radiculares foram expostos ao meio bucal por 7 dias para contaminação e, sob nova anestesia geral, foi realizada a remoção dos resíduos da câmara pulpar com auxílio de curetas e de irrigação com solução salina. Após a secagem e colocação de uma mecha de algodão na câmara pulpar, as cavidades de acesso foram restauradas com cimento à base de óxido de zinco e eugenol (IRM<sup>®</sup>; Dentsply Indústria e Comércio Ltda.).

Os cães permaneceram no biotério, sendo realizadas tomadas radiográficas quinzenalmente, com o objetivo de acompanhar o desenvolvimento da lesão periapical. Aos 45 dias após o selamento coronário, foram constatadas imagens radiolúcidas sugestivas de lesões periapicais experimentalmente induzidas.

Após isolamento dos dentes, anti-sepsia do campo operatório e remoção do cimento provisório, os canais radiculares foram submetidos à neutralização imediata do conteúdo séptico-tóxico de acordo com Leonardo (2008). Inicialmente limas tipo K, de nº 55 e / ou 50, foram introduzidas progressivamente no canal radicular no sentido coroa-ápice, acompanhadas pela irrigação / aspiração / inundação com solução de hipoclorito de sódio a 5,25% (pH 12,0). A seguir, a instrumentação foi realizada como descrito para o Grupo 1. No Grupo 2, após a secagem os canais radiculares foram imediatamente obturados da mesma maneira descrita para o Grupo 1, enquanto que no Grupo 3 foi empregado um curativo de demora à base de hidróxido de cálcio entre sessões.

#### *Curativo de demora entre sessões (Grupo 3)*

Nos dentes do Grupo 3 foram realizados todos os passos operatórios descritos no Grupo 2 até a colocação final do EDTA. Após irrigação com solução salina e secagem dos canais radiculares, os mesmos foram preenchidos com a pasta à base de hidróxido de cálcio (Calen; SS White Artigos Dentários Ltda; composição: 2,5 g Ca(OH)<sub>2</sub>, 0,5 g óxido de zinco p.a., 0,05 g colofônia, 1,75 mL polietilenoglicol 400). O curativo de demora foi aplicado com o auxílio da seringa rosqueável ML (S.S. White Artigos Dentários Ltda) e agulha longa 27G (Septoject XL 27; Septodont Brasil Ltda., Barueri, SP), com tope de borracha, na medida do

Comprimento Real de Trabalho, sendo realizadas tomadas radiográficas para a comprovação do preenchimento total do canal radicular. Após a colocação de uma mecha de algodão esterilizada na entrada do canal radicular, foi realizado o selamento coronário com cimento à base do óxido de zinco e eugenol IRM (Dentsply Ind. Com. Ltda., Petrópolis, RJ), por 14 dias (Leonardo *et al.*, 2002, 2006). Decorrido este período, os canais radiculares foram obturados da mesma maneira descrita para o Grupo 1.

No Grupo 4, foram induzidas lesões periapicais à semelhança dos Grupos 2 e 3, como previamente descrito, não sendo realizado o tratamento dos canais radiculares. Estes dentes foram utilizados como controle positivo. No Grupo 5, foram utilizados dentes com vitalidade pulpar, não submetidos ao tratamento endodôntico, sendo estes dentes utilizados como controle negativo. Estes grupos foram utilizados como controles para comparar os achados microscópicos obtidos após tratamento de canais radiculares nos Grupos 1, 2 e 3.

Os animais foram acompanhados durante todo o período experimental para observação de mudanças de hábitos alimentares, desenvolvimento de processos inflamatórios ou supuração dos tecidos, dentre outras anormalidades. Decorridos 180 dias do tratamento endodôntico, as hemi-arcadas foram radiografadas, e os animais foram submetidos à eutanásia por sobredose anestésica de Thionembutal<sup>®</sup>. As mandíbulas foram dissecadas, com auxílio de um bisturi, reduzidas em seu volume e as peças lavadas em água corrente. Para facilitar o processamento histológico, as peças foram seccionadas utilizando discos diamantados, sob constante refrigeração com água, sendo obtidos blocos das peças anatômicas contendo as raízes dentárias individualmente.

### **Processamento Histológico**

As peças foram submetidas à fixação em solução de formol tamponado a 10%, por 72 horas, à temperatura ambiente. Posteriormente, foram imersas em um recipiente de vidro contendo uma solução à base de EDTA a 20% (pH 7,4) e submetidas a desmineralização, acelerada pelo forno microondas (Sharp Carousel<sup>®</sup>, São Paulo, SP). Para a realização deste procedimento, o recipiente contendo as peças foi parcialmente imerso em outro recipiente de vidro contendo água e gelo, com o objetivo de retardar o aumento da temperatura e, conseqüentemente, incrementar o tempo de ação das microondas. O forno de microondas operou na freqüência de trabalho de 2450 MHz, correspondendo a uma freqüência de onda no vácuo de 12,2 cm, potência máxima nominal de 700 W, regulado em potência média / máxima à temperatura de 30°C para evitar alterações teciduais. As peças foram irradiadas por 10 minutos, com intervalos de 5 minutos entre as irradiações, por um período de 4 horas por dia. A completa desmineralização das amostras, avaliada por meio da penetração de



uma agulha nos tecidos para verificação da sua consistência e por meio de exame radiográfico das peças, foi obtida em aproximadamente 30 dias. Concluída a desmineralização, as peças foram neutralizadas em solução de sulfato de sódio a 5% (Sulfato de Sódio Anhido; J.T.Baker, Xalostoc, México) por 24 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, desidratadas em concentrações crescentes de álcool (Álcool Etilico Absoluto Anhidro®; J.T. Baker), diafanizadas em xilol (Xylol®; Merck) e incluídas em parafina (Histosec® Pastillen; Merck). Os blocos contendo dente e osso foram reduzidos pela microtomia a cortes seriados longitudinais com 5,0 µm de espessura. Para avaliação histopatológica, as lâminas foram coradas pela Hematoxilina e Eosina (HE).

### **Avaliação histológica e histomorfométrica**

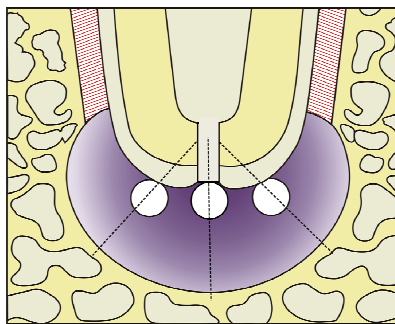
A avaliação microscópica do desfecho do tratamento endodôntico foi realizada em 83 raízes (24 raízes do Grupo 1, 18 raízes do Grupo 2, 21 raízes do Grupo 3 e 20 raízes do Grupo 4), uma vez que 13 raízes foram perdidas durante o processamento histológico. Dentes com vitalidade pulpar, cujas raízes apresentavam a região periapical com características de normalidade, foram usados como controle (Grupo 5; n = 24).

Os cortes histológicos corados por HE foram avaliados por microscopia de luz convencional (Zeiss Axio Imager, Carl Zeiss AG Light Microscopy, Göttingen, Alemanha) e de fluorescência (Olympus BX51, Olympus America Inc, Center Valley, PA, EUA) de acordo com parâmetros descrito previamente (Leonardo *et al.*, 2007; De-Rossi *et al.*, 2007; De-Rossi *et al.*, 2008; Tanomaru *et al.*, 2008), por 2 examinadores calibrados ( $\kappa = 0,87$ ). Para a análise morfométrica do tamanho das lesões periapicais foi utilizada videomicroscopia com o Software Zeiss AxioVision (Carl Zeiss AG Light Microscopy), em conjunto com o microscópio e videocâmara AxioCam MRc5 (Carl Zeiss AG Light Microscopy), no aumento de 4x, com o microscópio operando no modo fluorescente com uma lâmpada de mercúrio HBO 100 W / 2 e filtro I3, com as seguintes características: filtro de excitação de 460-500 nm, espelho dicromático de 510 e 515 nm. Para cada espécime, a área da lesão periapical foi delimitada e medida em mm<sup>2</sup> nas lâminas que representavam o maior diâmetro da lesão. A delimitação da lesão excluiu as estruturas intactas (ligamento periodontal, cimento e osso alveolar), facilmente identificadas pela intensa fluorescência verde, e incluiu áreas de reabsorção e infiltrado inflamatório, identificadas pela ausência de fluorescência e aparência escurecida. Os valores obtidos em cada grupo foram comparados por meio do teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn ( $\alpha = 0,05$ ).

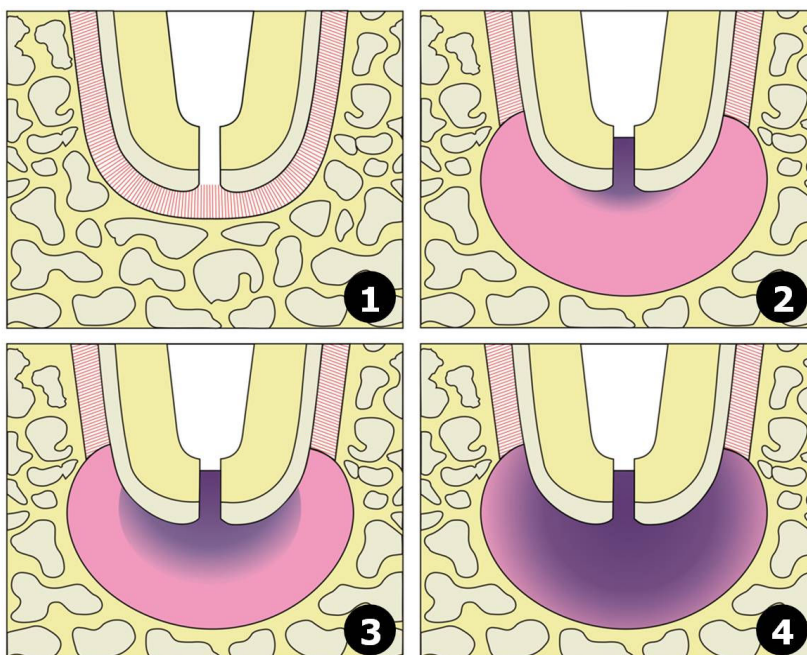
Pela microscopia de luz, indícios de reabsorção radicular externa foram estimados por meio da presença de lacunas de reabsorção no cimento e / ou dentina. O grau de

reabsorção dentária foi caracterizado de acordo com os seguintes escores: (1) ausência de reabsorção radicular, (2) presença de reabsorção cementária, (3) presença de reabsorção cementária e dentinária e a comparação entre os grupos realizada por meio do teste exato de Fisher ( $\alpha = 0,05$ ).

O número de células inflamatórias foi estimado em 3 campos representativos de cada corte, sendo utilizados 3 cortes por espécime no aumento de 100x. Para todas as amostras, a localização destes campos foi padronizada em três orientações ao redor do ápice radicular: na região correspondente ao centro do canal e a 45° do centro do canal para a direita e para a esquerda (Figura 1.1). Os valores obtidos em cada grupo foram comparados por meio do teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn ( $\alpha = 0,05$ ). A extensão do infiltrado inflamatório foi categorizada em (1) ausente, (2) presente e restrita ao forame apical, (3) presente até a metade da espessura do ligamento periodontal e (4) presente além da metade da espessura do ligamento periodontal (Figura 1.2). A comparação entre os grupos realizada por meio do teste exato de Fisher ( $\alpha = 0,05$ ).



**Figura 1.1.** Visão esquemática das regiões apical e periapical indicando os três campos microscópicos utilizados para contagem de células localizados na área do ligamento periodontal / lesão periapical, no centro do ligamento periodontal e a 45° à direita e à esquerda. Adaptado de Tanomaru (2004).



**Figura 1.2.** Visão esquemática das regiões apical e periapical indicando os escores atribuídos à extensão da distribuição do infiltrado inflamatório na região periapical. Adaptado de Tanomaru (2004).

### **Avaliação radiográfica**

O exame radiográfico periapical dos dentes utilizados neste estudo foi realizado de acordo com a técnica do paralelismo, previamente à indução das lesões periapicais, 45 dias após a contaminação dos canais radiculares e 180 dias após tratamento endodôntico, utilizando um dispositivo para padronização de tomadas radiográficas em cães (Cordeiro *et al.*, 1995). Foram utilizados filmes periapicais Ultraspeed<sup>®</sup> de tamanho 2 (Eastman Kodak Company, Rochester, EUA), aparelho de raios-X odontológico Heliodent<sup>®</sup> (Siemens, New York, EUA), com 60 kVp e 10 mA e tempo de exposição de 1 segundo. As radiografias foram reveladas manualmente pelo método tempo / temperatura e arquivadas em cartelas plásticas.

As avaliações radiográfica e tomográfica foram realizadas por 3 examinadores calibrados ( $\kappa = 0,96$ ). Os parâmetros avaliados no exame radiográfico convencional incluíram a integridade da lâmina dura, presença de áreas radiolúcidas na região periapical sugestivas de lesão periapical e presença de reabsorção radicular, no período de 45 dias após contaminação dos canais radiculares e 180 dias após tratamento endodôntico. Os grupos experimentais (1, 2, 3, 4 e 5) foram comparados entre si em cada período experimental e os dados obtidos para um mesmo grupo foram comparados nos períodos pré e pós-tratamento de canais radiculares por meio do teste exato de Fisher ( $\alpha = 0,05$ ).

Para mensuração das lesões periapicais, quando presentes, as radiografias das hemi-arcadas, obtidas previamente à morte dos animais, foram digitalizadas com auxílio de scanner óptico (Scanjet 7450 c series - Programa versão 3.0.2; Hewlett-Packard, San Diego, EUA), com resolução de 1.200 d.p.i. (*dots per inch*) e transferidas para o programa Image J 1.28 u (National Institutes of Health, Bethesda, EUA) como descrito previamente (De-Rossi *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2008b). Com o objetivo de calibrar o programa, foi realizada a medida da distância da ponta da cúspide até a borda cervical da face distal de cada dente, com compasso de ponta seca, sendo esta medida transferida para o programa. A delimitação e a medida da área radiolúcida sugestiva de lesão periapical, presente em cada raiz, foi determinada em mm<sup>2</sup>.

### **Avaliação tomográfica**

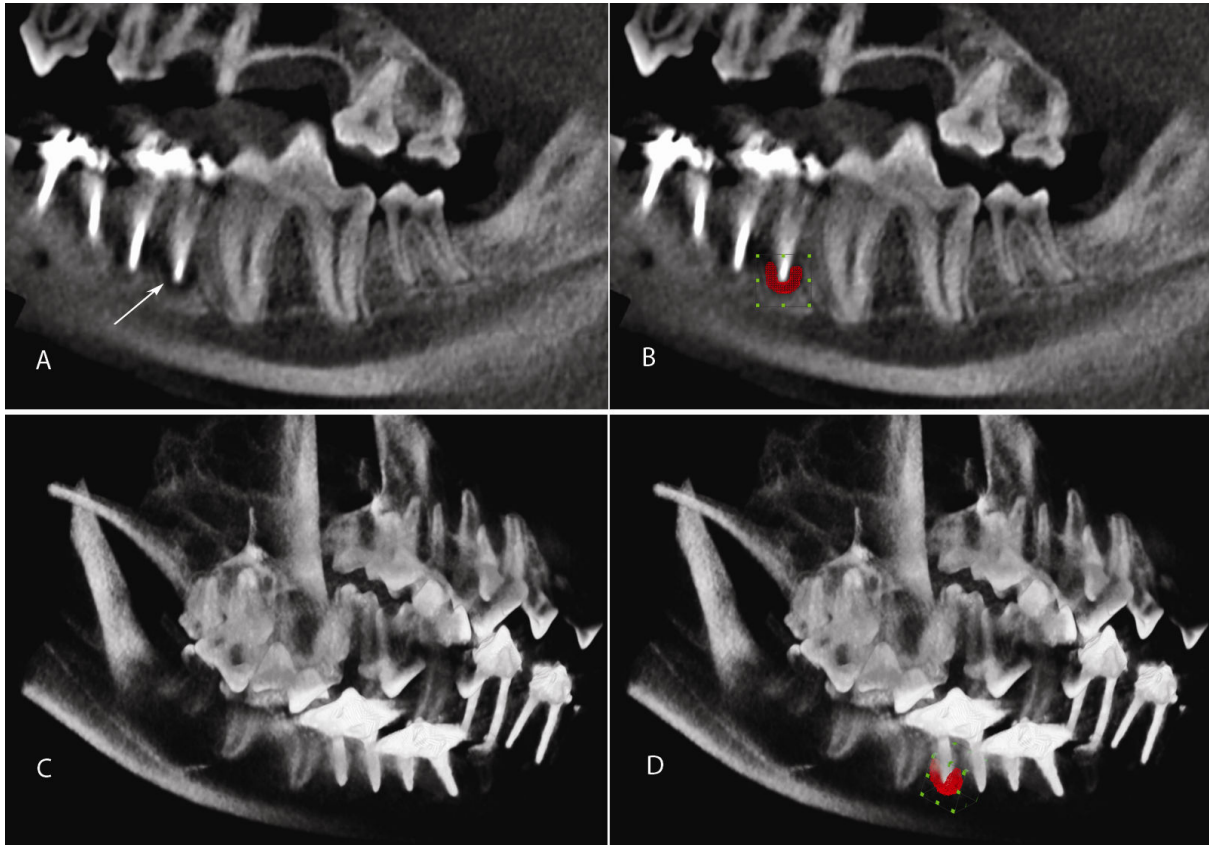
Os exames tomográficos foram realizados em equipamento de tomografia computadorizada de feixe cônico modelo NewTom 3G (QR Srl, Verona, Itália). Para este estudo foi utilizado, para padronização da técnica, 120 kv e 3,6 mA, com FOV (*field of view*) de 9 polegadas e tempo de exposição de 36 segundos. O aparelho NewTom 3G capta 360 imagens com intervalo de 1° entre elas, em 36 segundos, com uma resolução de

reconstrução da imagem de  $512 \times 512$  pixels e 12 bits por pixel (escala de cinza 4096). Com o objetivo de permitir uma comparação direta com a radiografia periapical, foi padronizada a utilização de cortes de 1 milímetro de espessura com 0,5 milímetro de espaçamento entre os cortes, em vista sagital. A delimitação e a medida da área radiolúcida sugestiva de lesão periapical, presente em cada raiz, foi determinada em  $\text{mm}^2$ . Os parâmetros avaliados pela tomografia computadorizada de feixe cônico foram os mesmos descritos para a avaliação radiográfica.

Para avaliação volumétrica da lesão periapical, as imagens adquiridas pela tomografia foram exportadas em formato DICOM3 (*Digital Imaging and Communications in Medicine* versão 3), com tamanho do voxel isotrópico de 0,3 mm. A seguir, os dados foram importados para o Software Amira v.4.2 (Visage Imaging Inc., Carlsbad, EUA) e o posicionamento das imagens corrigido utilizando as ferramentas de alinhamento do programa. Foram obtidas seções tomográficas nos planos axial, coronal e sagital, com espessura de 0,3 mm, para realização das segmentações. Inicialmente foi selecionada a região de interesse (ROI), restrita ao terço apical de cada raiz e com extensão de 5 mm abaixo do ápice radicular, com o objetivo de assegurar que as medidas de todas as lesões fossem padronizadas. A seguir a lesão foi demarcada nos cortes axial, sagital e coronal e a área da lesão foi segmentada em cada fatia utilizando pincéis de segmentação interativos. Em cada fatia, a borda da lesão periapical estava restrita à área de radiolucência periapical excluindo-se o ápice radicular (Figura 1.3). Os critérios de segmentação limitavam a escala de cinza entre -100 e +380, conforme validado previamente para o aparelho NewTom 3G com FOV de 9 polegadas (Simon *et al.*, 2006; Loubele *et al.*, 2008). O volume total da lesão foi calculado pela soma dos volumes de cada fatia da lesão, obtidas em cada segmentação (Agbaje *et al.*, 2007), em  $\text{mm}^3$ . Os grupos foram comparados entre si nos períodos pré- e pós-tratamento de canais radiculares por meio do teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós teste de Dunn ( $\alpha = 0,05$ ). O volume da lesão periapical pré- e pós-tratamento foi comparado para cada grupo considerando-se a dependência entre os dados por meio do teste de Wilcoxon ( $\alpha = 0,05$ ).

O efeito do tratamento endodôntico na dinâmica da lesão periapical foi classificado de acordo com a redução ou aumento do tamanho da lesão após tratamento de canais radiculares quando comparado ao tamanho da lesão previamente ao tratamento (Katebzadeh *et al.*, 1999). Os resultados foram classificados de acordo com os seguintes parâmetros: (1) Surgimento da lesão ou aumento do diâmetro, se a lesão tivesse aumentado pelo menos  $1 \text{ mm}^2$  pela avaliação radiográfica ou  $1 \text{ mm}^3$  pela tomografia computadorizada de feixe cônico; (2) Tamanho da lesão não modificado pelo tratamento endodôntico, se o aumento ou diminuição da lesão tivesse sido menor que  $1 \text{ mm}^2 / 1 \text{ mm}^3$ ; (3) Redução do

diâmetro da lesão, se a lesão tivesse diminuído pelo menos  $1 \text{ mm}^2 / 1 \text{ mm}^3$ ; (4) Lesão periapical ausente. Os desfechos 1 e 2 foram considerados desfavoráveis enquanto os desfechos 3 e 4 foram considerados favoráveis. Os resultados obtidos foram comparados por meio do teste exato de Fisher ( $\alpha = 0,05$ ).



**Figura 1.3.** Exemplo do procedimento de segmentação realizado para as imagens obtidas pela tomografia computadorizada de feixe cônico. A lesão visualizada (seta) em uma secção sagital bidimensional (A) foi delimitada em vermelho (B). A imagem representativa do volume da lesão foi obtida após reconstrução tridimensional da mandíbula (C) e a lesão foi delimitada em vermelho (D). As caixas verdes mostram a região de interesse (ROI) selecionada.

### **Avaliação da acurácia dos métodos imaginológicos de diagnóstico**

Com base na presença de inflamação detectada histologicamente foram calculados os valores Verdadeiro-Positivos (VP), Falso-Positivos (FP), Verdadeiro-Negativos (VN), Falso-Negativos (FN) para a radiografia periapical convencional e para a tomografia computadorizada de feixe cônico. Os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia (Verdadeiro-Positivos + Verdadeiro-Negativos) para cada um dos métodos de imagiologia foram estimados e a comparação entre eles foi realizada por meio do teste exato de Fisher ( $\alpha = 0,05$ ). As medidas das áreas das lesões

periapicais obtidas pela radiografia periapical e pela tomografia computadorizada de feixe cônico foram comparadas àquelas obtidas pela avaliação microscópica por meio do cálculo do coeficiente de correlação intraclasse (ICC).

## RESULTADOS

### ***Interrupção da lâmina dura, presença de áreas radiolúcidas na região periapical e presença de reabsorção radicular externa foram detectadas pela tomografia computadorizada de feixe cônico e radiografia periapical após a indução de lesões periapicais e após o tratamento de canais radiculares***

A lâmina dura apresentava-se íntegra em todos os dentes previamente à indução da lesão periapical e não existiam áreas radiolúcidas indicativas de lesão periapical ou de reabsorção radicular externa em nenhum espécime. Aos 45 dias após a contaminação dos canais radiculares, nos espécimes dos Grupos 2, 3 e 4, foram detectadas descontinuidade da lâmina dura e presença de áreas radiolúcidas sugestivas de lesão periapical em todos os espécimes e reabsorção radicular externa em 61,1%, 61,9% e 62,2% deles, tanto pela tomografia computadorizada de feixe cônico como pelo exame radiográfico periapical convencional, sem diferença entre os métodos ( $p > 0,05$ ) (Figura 1.4, Tabela 1.2).

Aos 180 dias após o tratamento de canais radiculares, a avaliação pela tomografia computadorizada de feixe cônico e o exame radiográfico periapical permitiram a detecção de áreas radiolúcidas sugestivas de lesão periapical e descontinuidade da lâmina dura em porcentagem similar dos dentes com vitalidade pulpar submetidos ao tratamento endodôntico (Grupo 1;  $p > 0,05$ ), porém subestimados em relação ao exame microscópico ( $p < 0,0001$ ). Uma pequena porcentagem de espécimes com reabsorção radicular foi identificada independente do método de avaliação utilizado ( $p = 0,1264$ ).

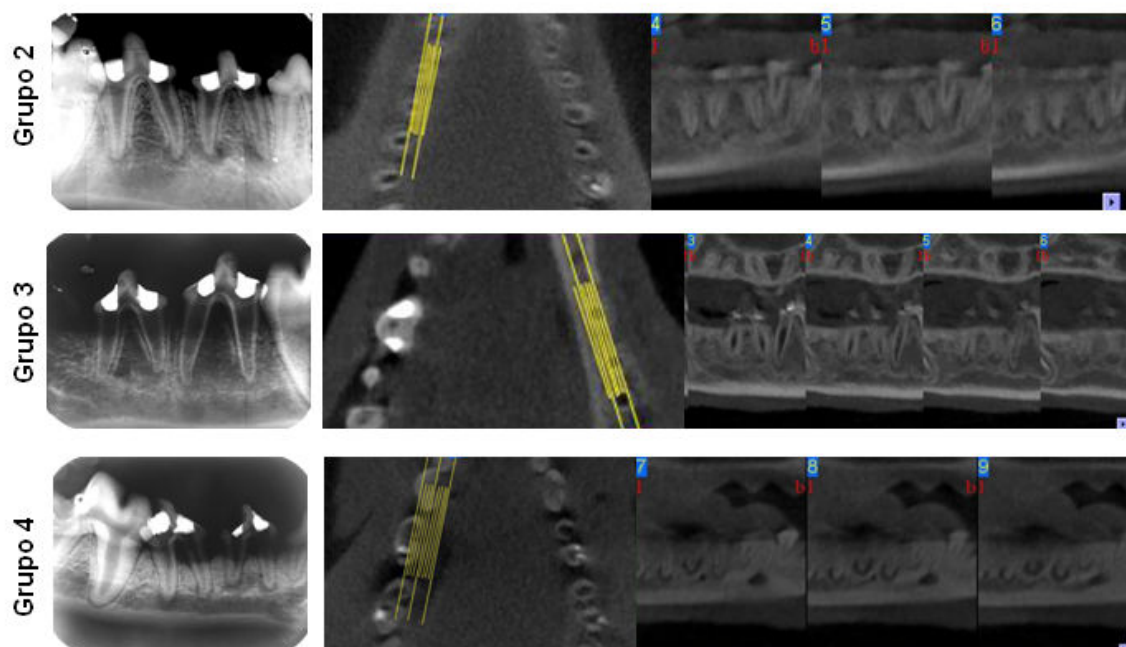
Nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única (Grupo 2), foram detectados descontinuidade da lâmina dura e presença de áreas radiolúcidas sugestivas de lesão periapical em todos os espécimes tanto pela tomografia computadorizada de feixe cônico, como pelo exame radiográfico periapical quanto pela avaliação histológica ( $p > 0,05$ ). Presença de reabsorção radicular externa foi detectada pela tomografia computadorizada de feixe cônico, pelo exame radiográfico e pela avaliação microscópica em aproximadamente 80% dos espécimes deste grupo ( $p > 0,05$ ), diferentemente dos dentes com vitalidade pulpar submetidos ao tratamento endodôntico (Grupo 1) e dos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora (Grupo 3), os quais apresentaram menores porcentagens de espécimes com reabsorções radiculares ( $p < 0,0001$ ).

Nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora, descontinuidade da lâmina dura e presença de áreas radiolúcidas sugestivas de lesão periapical foram detectadas em 71,4% das amostras por meio do exame radiográfico periapical enquanto que a tomografia computadorizada de feixe cônico possibilitou a detecção em todos os espécimes ( $p < 0,0001$ ), similarmente à avaliação microscópica ( $p > 0,05$ ). Nos dentes portadores de lesão periapical experimentalmente induzida não submetidos ao tratamento endodôntico (Grupo 4) foram detectados descontinuidade da lâmina dura, presença de reabsorção radicular externa e áreas radiolúcidas sugestivas de lesão periapical em todos os espécimes, tanto pela tomografia computadorizada de feixe cônico, quanto pelo exame radiográfico periapical e pela avaliação microscópica (Figura 1.5, Tabela 1.2).

**Tabela 1.2.** Resultados da avaliação tomográfica, radiográfica e microscópica 45 dias após contaminação dos canais radiculares e 180 dias após tratamento endodôntico, com relação à descontinuidade da lâmina dura, presença de áreas radiolúcidas sugestivas de lesão periapical e presença de reabsorção radicular externa. Os valores encontram-se expressos em número de raízes e porcentagem

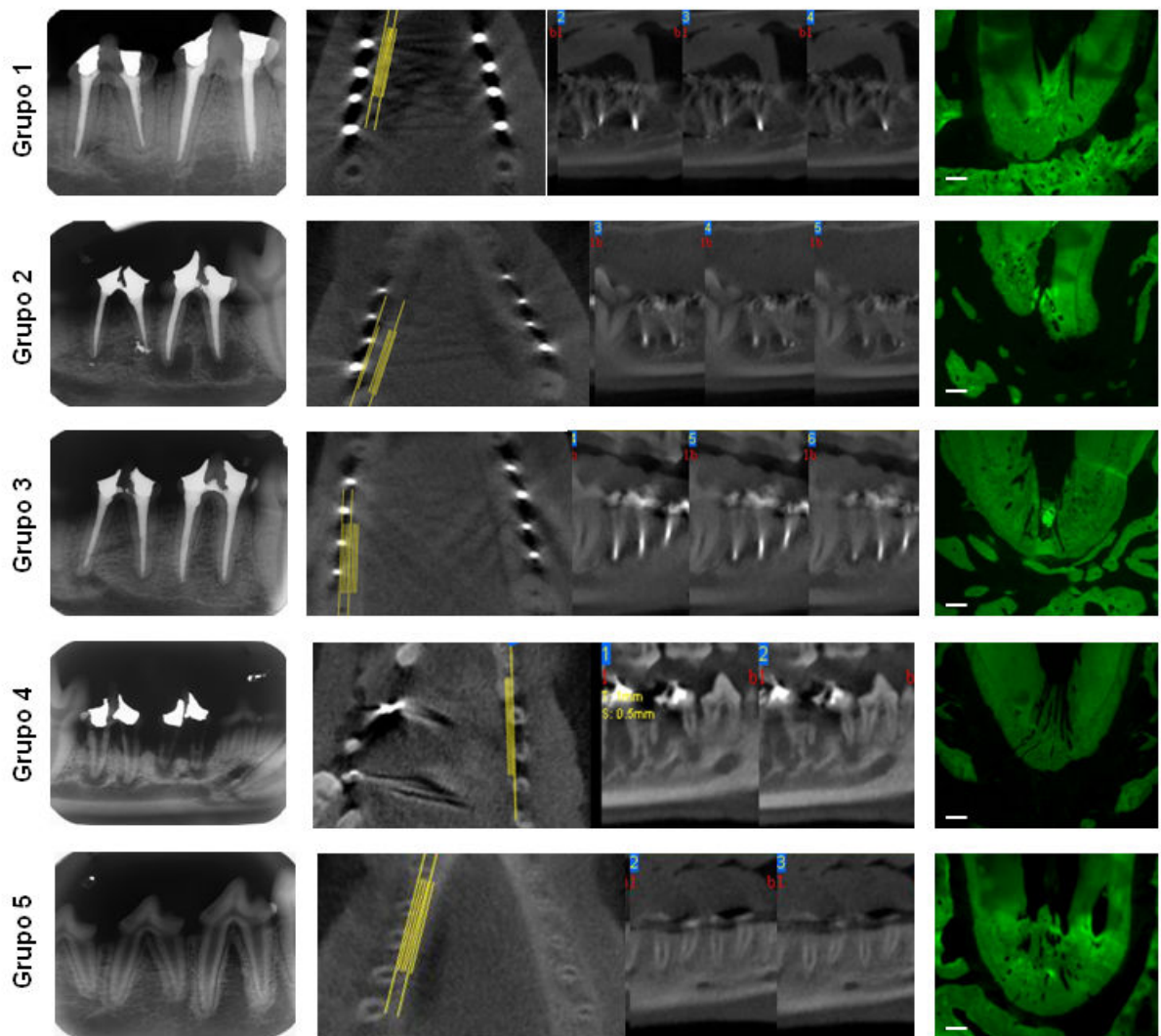
Parâmetro avaliado	Método de avaliação	Período experimental						
		45 dias após contaminação			180 dias após tratamento endodôntico			
		Grupo 2 (n = 18)	Grupo 3 (n = 21)	Grupo 4 (n = 20)	Grupo 1 (n = 24)	Grupo 2 (n = 18)	Grupo 3 (n = 21)	Grupo 4 (n = 20)
Descontinuidade da lâmina dura	Tomográfico	18 (100%)	21 (100%)	20 (100%)	11 (45,8%)	18 (100%)	21 (100%)	20 (100%)
	Radiográfico	18 (100%)	21 (100%)	20 (100%)	9 (37,5%)	18 (100%)	15 (71,4%)	20 (100%)
	Microscópico	-	-	-	- *	- *	- *	- *
Presença de áreas radiolúcidas periapicais	Tomográfico	18 (100%)	21 (100%)	20 (100%)	11 (45,8%)	18 (100%)	21 (100%)	20 (100%)
	Radiográfico	18 (100%)	21 (100%)	20 (100%)	9 (37,5%)	18 (100%)	15 (71,4%)	20 (100%)
	Microscópico	-	-	-	18 (75%)	18 (100%)	21 (100%)	20 (100%)
Presença de reabsorção radicular externa	Tomográfico	11 (61,1%)	13 (61,9%)	13 (62,2%)	2 (8,3%)	16 (88,8%)	13 (61,9%)	20 (100%)
	Radiográfico	11 (61,1%)	13 (61,9%)	13 (62,2%)	2 (8,3%)	16 (88,8%)	13 (61,9%)	20 (100%)
	Microscópico	-	-	-	4 (16,6%)	15 (83,3%)	13 (61,9%)	20 (100%)

- avaliação microscópica não foi realizada; \* lâmina dura é uma característica radiográfica / tomográfica



**Figura 1.4.** Radiografia periapical convencional (*esquerda*) e tomografia computadorizada de feixe cônico (*direita*) representativas de espécimes do Grupo 2 (tratamento endodôntico em dentes com lesão periapical em sessão única), Grupo 3 (tratamento endodôntico em dentes com lesão periapical utilizando hidróxido de cálcio como curativo de demora) e Grupo 4 (dentes com lesão periapical experimentalmente induzida não submetidos ao tratamento endodôntico). Vistas axiais e sagitais são mostradas para a tomografia computadorizada de feixe cônico. As linhas amarelas nas imagens representativas da vista axial indicam a sequência e o ângulo de corte no sentido vestibulo-lingual. Os números dentro da caixa azul nas imagens representativas da vista sagital indicam a posição do corte na sequência apresentada na vista axial.





**Figura 1.5.** Radiografia periapical convencional (*esquerda*), tomografia computadorizada de feixe cônico (*centro*) e fotomicrografia (*direita* ; Barra = 300  $\mu$ m) representativas de espécimes do Grupo 1 (tratamento endodôntico em dentes com vitalidade pulpar), Grupo 2 (tratamento endodôntico em dentes com lesão periapical em sessão única), Grupo 3 (tratamento endodôntico em dentes com lesão periapical utilizando hidróxido de cálcio como curativo de demora), Grupo 4 (dentes com lesão periapical experimentalmente induzida não submetidos ao tratamento endodôntico) e Grupo 5 (dentes com vitalidade pulpar não submetidos ao tratamento endodôntico). Vistas axiais e sagitais são mostradas para a tomografia computadorizada de feixe cônico. As linhas amarelas nas imagens representativas da vista axial indicam a sequência e o ângulo de corte no sentido vestibulo-ligal. Os números dentro da caixa azul nas imagens representativas da vista sagital indicam a posição do corte na sequência apresentada na vista axial.

Quanto à caracterização histológica do grau de reabsorção radicular externa, nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora, a reabsorção radicular externa estava restrita ao cimento, enquanto nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única ou naqueles dentes com lesão periapical não submetidos ao tratamento endodôntico, havia reabsorção radicular externa do cimento e dentina ( $p = 0,0002$ ). Nos dentes com vitalidade pulpar submetidos ao tratamento endodôntico foi observada reabsorção radicular em alguns espécimes, o que não foi diferente dos dentes que apresentavam vitalidade pulpar não submetidos ao tratamento endodôntico ( $p > 0,05$ ) (Tabela 1.3).

**Tabela 1.3.** Resultados da avaliação microscópica 180 dias após tratamento endodôntico com relação à caracterização do grau de reabsorção radicular externa. Os valores encontram-se expressos em número de raízes e porcentagem

Escore	Característica microscópica	Grupos Experimentais				
		Grupo 1 (n = 24)	Grupo 2 (n = 18)	Grupo 3 (n = 21)	Grupo 4 (n = 20)	Grupo 5 (n = 24)
1	Ausência de reabsorção	20 (83,4%)	3 (16,7%)	9 (42,9%)	0	24 (100%)
2	Reabsorção cementária	4 (16,6%)	12 (66,6%)	12 (57,1%)	15 (75%)	0
3	Reabsorção dentinária	0	3 (16,7%)	0	5 (25%)	0

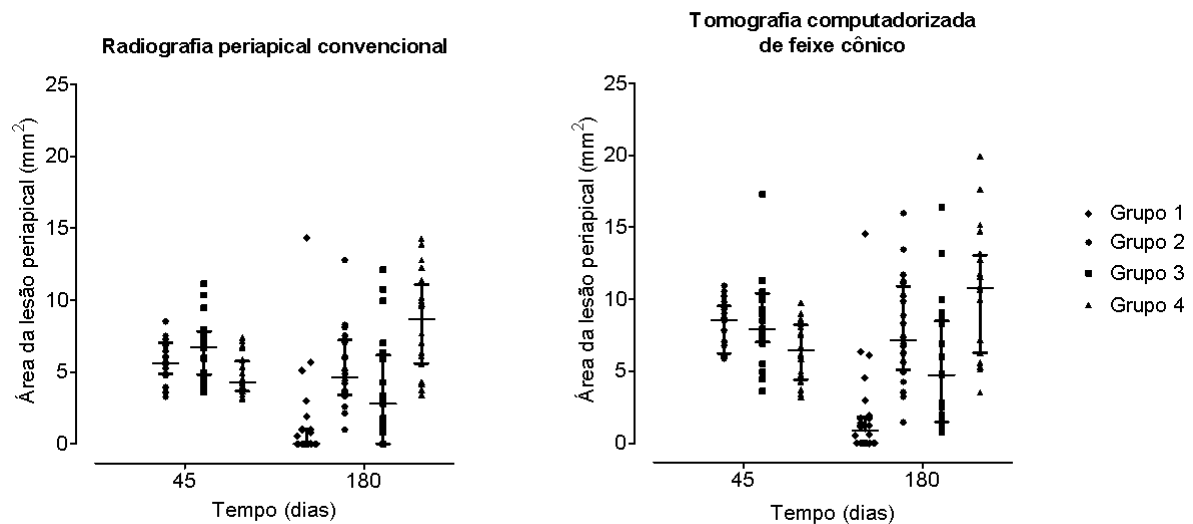
***O diâmetro da lesão periapical avaliado pela tomografia computadorizada de feixe cônico foi semelhante à avaliação microscópica, porém foi menor quando avaliado pela radiografia periapical convencional***

A avaliação do diâmetro da lesão por meio da tomografia computadorizada de feixe cônico, em vista sagital, revelou que as lesões periapicais apresentavam extensão méso-distal maiores do que os valores obtidos pela avaliação radiográfica, tanto no período pré como no período pós-tratamento endodôntico (Figura 1.6) ( $p < 0,0001$ ).

Aos 180 dias após o tratamento de canais radiculares, houve redução da extensão méso-distal mediana das lesões periapicais nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora (Grupo 3) em relação ao diâmetro inicial da lesão aos 45 dias após a contaminação dos canais

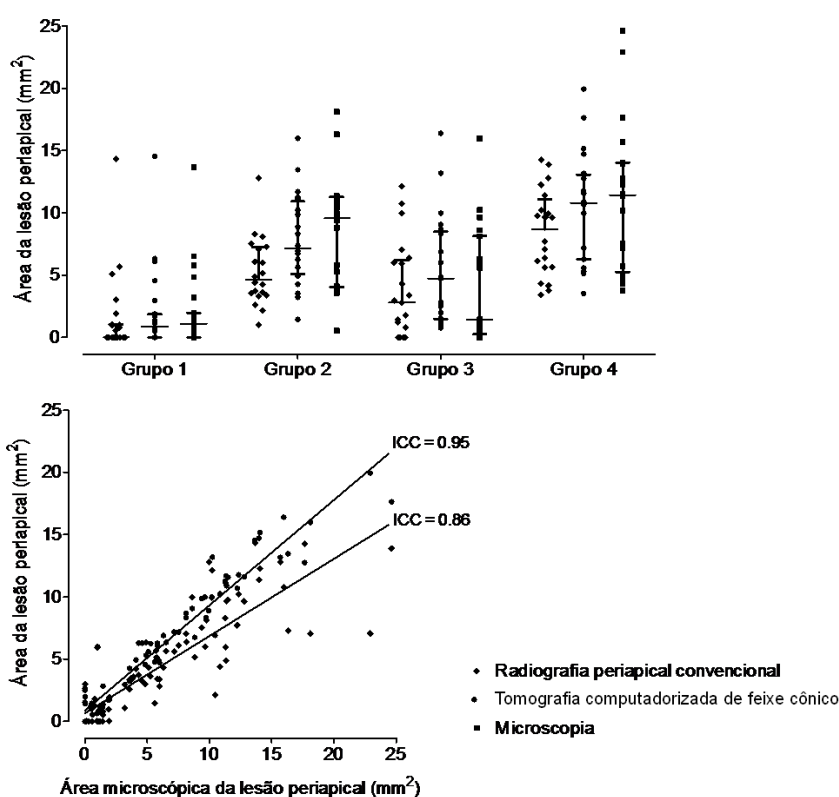
radiculares ( $p < 0,0001$ ), tanto pela avaliação tomográfica como pela avaliação radiográfica. Entretanto, o percentual mediano de redução do tamanho da lesão, calculado em relação à medida inicial da lesão, foi maior para a avaliação radiográfica (61,9%) comparado a avaliação pela tomografia computadorizada de feixe cônico (43,6%) ( $p = 0,0479$ ).

Por outro lado, nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única (Grupo 2), o diâmetro méso-distal da lesão periapical após o tratamento de canais radiculares permaneceu semelhante ao observado após a contaminação dos canais radiculares ( $p > 0,05$ ). O percentual mediano de redução do tamanho da lesão não foi diferente quando a avaliação foi realizada utilizando-se tomografias computadorizadas (6,5%) ou radiografias periapicais convencionais (10,2%) ( $p > 0,05$ ). Nos dentes com necrose pulpar e lesão periapical não submetidos ao tratamento endodôntico, houve um aumento progressivo do tamanho da lesão com o passar do tempo ( $p < 0,0001$ ).



**Figura 1.6.** As lesões periapicais foram delimitadas e o diâmetro de cada lesão determinado utilizando-se tomografias computadorizadas de feixe cônico ou radiografias periapicais convencionais aos 45 dias após contaminação dos canais radiculares e aos 180 dias após tratamento endodôntico. Pontos representam espécimes do Grupo 1 (*losango* – tratamento endodôntico em dentes com vitalidade pulpar), Grupo 2 (*círculo* – tratamento endodôntico em dentes com lesão periapical em sessão única), Grupo 3 (*quadrado* - tratamento endodôntico em dentes com lesão periapical utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora) e Grupo 4 (*triângulo* - dentes com necrose pulpar e lesão periapical não submetidos ao tratamento endodôntico). Os valores são expressos em milímetros quadrados (mm<sup>2</sup>) e cada ponto representa um espécime; barras horizontais representam mediana e quartis.

As medidas dos diâmetros das lesões periapicais obtidas pela avaliação pela tomografia computadorizada de feixe cônico ou pela radiografia periapical convencional foram comparadas às medidas obtidas pela avaliação microscópica (padrão-ouro), aos 180 dias após o tratamento de canais radiculares. Houve maior correlação entre os valores obtidos pela tomografia computadorizada e pela avaliação microscópica ( $ICC = 0,95$ ) e menor correlação entre os valores obtidos pela radiografia periapical convencional e pela avaliação microscópica ( $ICC = 0,86$ ) (Figura 1.7).



**Figura 1.7.** O diâmetro de cada lesão foi determinado utilizando-se tomografias computadorizadas de feixe cônico, radiografias periapicais convencionais ou por meio de avaliação microscópica aos 180 dias após tratamento endodôntico para os espécimes do Grupo 1 (*losango* – tratamento endodôntico em dentes com vitalidade pulpar), Grupo 2 (*círculo* – tratamento endodôntico

em dentes com lesão periapical em sessão única), Grupo 3 (*quadrado* - tratamento endodôntico em dentes com lesão periapical utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora) e Grupo 4 (*triângulo* - dentes com necrose pulpar e lesão periapical não submetidos ao tratamento endodôntico). Os valores são expressos em milímetros quadrados (mm<sup>2</sup>) e cada ponto representa um espécime; barras horizontais representam mediana e quartis (**superior**). As medidas obtidas pelas avaliações tomográfica e radiográfica foram comparadas aos valores obtidos pela avaliação microscópica considerada o padrão-ouro. Os coeficientes de correlação intraclassa (ICC) foram calculados e são apresentados no gráfico (**inferior**).

***A tomografia computadorizada de feixe cônico apresenta maior acurácia na detecção de lesões periapicais do que a radiografia periapical convencional***

A presença e distribuição do infiltrado inflamatório na região apical e periapical dos dentes submetidos ao tratamento de canais radiculares foi investigada e utilizada como padrão-ouro indicativo da presença de lesão periapical. Após a realização da obturação dos canais radiculares, nos dentes com lesão periapical e submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora, o infiltrado inflamatório estava localizado até a metade da extensão do ligamento periodontal apical, semelhante aos dentes com vitalidade pulpar submetidos ao tratamento endodôntico ( $p > 0,05$ ). Por outro lado, nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única, o infiltrado inflamatório estava localizado além da metade da extensão do ligamento periodontal, semelhante aos dentes com lesão periapical não submetidos ao tratamento endodôntico ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 1.4).

**Tabela 1.4.** Resultados da avaliação microscópica 180 dias após tratamento endodôntico com relação à extensão do infiltrado inflamatório nas regiões apical e periapical. Os valores encontram-se expressos em número de raízes e porcentagem

Escore	Extensão do infiltrado inflamatório	Grupos Experimentais			
		Grupo 1 (n = 24)	Grupo 2 (n = 18)	Grupo 3 (n = 21)	Grupo 4 (n = 20)
1	Ausente	6 (25%)	0	0	0
2	Restrito ao forame apical	9 (37,5%)	0	6 (28,6%)	0
3	Até a metade da espessura do ligamento periodontal	9 (37,5%)	4 (22,2%)	9 (42,8%)	0
4	Além da metade da espessura do ligamento periodontal	0	14 (77,8%)	6 (28,6%)	20 (100%)

A presença de um infiltrado inflamatório na região apical e periapical foi considerada como lesão periapical detectada microscopicamente e estava presente em 93% dos casos. A utilização da tomografia computadorizada de feixe cônico permitiu a detecção de lesões periapicais em 84% das raízes enquanto a radiografia periapical convencional possibilitou a detecção em 75% das raízes ( $p = 0,001$ ) (Tabela 1.5). Os resultados verdadeiro-positivo (VP), falso-positivo (FP), verdadeiro-negativo (VN) e falso-negativo (FN) para cada um dos

métodos de avaliação estão descritos na Tabela 1.6.

**Tabela 1.5.** Número de raízes com lesão periapical detectada pela radiografia periapical convencional, tomografia computadorizada de feixe cônico e microscopia

Grupos Experimentais	Método de avaliação		
	Radiográfico	Tomográfico	Microscópico
Grupo 1 (n = 24)	9	11	18
Grupo 2 (n = 18)	18	18	18
Grupo 3 (n = 21)	15	21	21
Grupo 4 (n = 20)	20	20	20
Total (n = 83)	62 (75%)	70 (84%)	77 (93 %)

**Tabela 1.6.** Valores verdadeiro-positivos (VP) e falso-positivos (FP) e valores verdadeiro-negativos (VN) e falso-negativos (FN) para detecção de lesões periapicais para a tomografia computadorizada de feixe cônico ou radiografias periapicais convencionais, considerando a avaliação microscópica como padrão-ouro

Método de avaliação	Detecção de lesão periapical		VP	FP	VN	FN
	Positivo	Negativo				
<b>Radiográfico</b>	62	21	62	0	6	15
<b>Tomográfico</b>	70	13	70	0	6	7

A sensibilidade e a especificidade dos métodos para diagnóstico da lesão periapical foram calculadas (Tabela 1.7). A sensibilidade foi mais alta para a tomografia computadorizada de feixe cônico uma vez que por meio deste método foi possível identificar um maior número de resultados positivos em raízes que microscopicamente apresentavam lesões periapicais ( $p = 0,043$ ). Por outro lado, a especificidade para detectar lesões periapicais, medida pela capacidade do método apresentar um resultado negativo em raízes não portadoras de lesão periapical, foi semelhante entre a tomografia computadorizada de feixe cônico e a radiografia periapical convencional ( $p > 0,05$ ).

Considerando que a avaliação microscópica não é possível clinicamente, é importante determinar, por meio de estudos experimentais, a probabilidade dos métodos de diagnóstico de identificar a lesão periapical quando ela está presente ou não identificá-la

quando ela estiver ausente, por meio do cálculo dos valores preditivos positivo e negativo, respectivamente. A probabilidade de detectar a lesão periapical quando ela estava presente (valor preditivo positivo) foi semelhante para a tomografia computadorizada de feixe cônico e para a radiografia periapical convencional ( $p > 0,05$ ), enquanto que a probabilidade de não detectar a lesão quando ela estava ausente (valor preditivo negativo) foi maior para a tomografia computadorizada de feixe cônico do que para a radiografia periapical convencional ( $p = 0,002$ ) (Tabela 1.7).

A acurácia dos métodos para diagnóstico da lesão periapical foi determinada pela soma entre os valores verdadeiro-positivos e os valores verdadeiro-negativos para cada método e foi maior para a tomografia computadorizada de feixe cônico comparado a radiografia periapical convencional ( $p = 0,028$ ) (Tabela 1.7).

**Tabela 1.7.** Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia no diagnóstico (VP + VN) para a radiografia periapical convencional e para a tomografia computadorizada de feixe cônico, calculados utilizando a avaliação microscópica como padrão-ouro

Método de avaliação	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	Acurácia
Radiográfico	0,80	1	1	0,28	0,83
Tomográfico	0,91	1	1	0,46	0,92

***A avaliação tridimensional da lesão periapical revelou desfecho mais favorável para dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora***

Considerando que a tomografia computadorizada de feixe cônico representou com fidelidade a resposta inflamatória na região periapical nos dentes com lesão periapical, o volume das lesões foi estimado por meio desta técnica e o desfecho do tratamento endodôntico foi categorizado comparando-se o tamanho das lesões remanescentes ao tamanho inicial das lesões.

As lesões periapicais induzidas experimentalmente (Grupos 2, 3 e 4) apresentaram volumes semelhantes previamente ao tratamento de canais radiculares, quando avaliadas pela tomografia computadorizada de feixe cônico ou pela radiografia periapical convencional ( $p > 0,05$ ) (Tabela 1.8). Após o tratamento de canais radiculares, houve diminuição do volume das lesões para os dentes submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o

hidróxido de cálcio como curativo de demora ( $p = 0,025$ ), enquanto nos dentes submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única o volume da lesão aumentou ( $p < 0,0001$ ). Nos dentes com lesão periapical não submetidos ao tratamento endodôntico houve aumento progressivo do volume da lesão ( $p = 0,0002$ ). Aos 180 dias pós-tratamento de canais radiculares o volume da lesão periapical determinado pela tomografia computadorizada de feixe cônico nos dentes com lesão periapical submetido ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora foi semelhante àquele observado em dentes com vitalidade pulpar submetidos ao tratamento endodôntico ( $p > 0,05$ ) e menor do que nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única ( $p < 0,0001$ ), nos quais o volume da lesão foi semelhante aos dentes com lesão periapical não submetidos ao tratamento endodôntico ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 1.8.** Medida do volume das lesões periapicais em  $\text{mm}^3$ , para os diferentes grupos experimentais, 45 dias após a contaminação dos canais radiculares e 180 dias após a realização do tratamento endodôntico. Valores estão expressos como mediana e 1º e 3º quartis

Período experimental	Grupos Experimentais			
	Grupo 1 (n = 24)	Grupo 2 (n = 24)	Grupo 3 (n = 24)	Grupo 4 (n = 24)
45 dias após contaminação	-	7,98	10,63	9,47
		5,61 - 11,55	4,66 - 19,89	5,61 - 11,91
180 dias após tratamento endodôntico	0	14,1	6,21	13,73
	0 - 14,13	12,51 - 17,25	4,72 - 7,85	7,02 - 30,72

Após o tratamento de canais radiculares, foram detectados desfechos favoráveis identificados como lesões ausentes ou reduzidas, em 51 raízes (70,8%) nos Grupos 1, 2 e 3 quando avaliado por radiografia periapical convencional, enquanto pela tomografia computadorizada de feixe cônico foram detectados desfechos favoráveis em 22 raízes (30,5%) (Tabela 1.9) ( $p < 0,0001$ ). Desfechos desfavoráveis, caracterizados pela manutenção ou aumento da extensão da lesão foram mais comuns nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento em sessão única do que naqueles em que foi utilizado o hidróxido de cálcio como curativo de demora, quando avaliado pela tomografia computadorizada de feixe cônico ( $p = 0,023$ ), porém não foi possível detectar essa diferença pela radiografia periapical convencional ( $p > 0,05$ ). Nos animais que apresentavam lesão periapical não



submetidos ao tratamento endodôntico houve aumento progressivo da lesão periapical tanto pela avaliação radiográfica quanto pela tomográfica.

**Tabela 1.9.** Desfecho do tratamento endodôntico determinado pela tomografia computadorizada de feixe cônico comparado à avaliação radiográfica com relação ao tamanho da lesão

Desfecho	Lesão Periapical	Métodos de avaliação					
		Tomográfico			Radiográfico		
		Grupo 1 (n = 24)	Grupo 2 (n = 24)	Grupo 3 (n = 24)	Grupo 1 (n = 24)	Grupo 2 (n = 24)	Grupo 3 (n = 24)
Favorável	Redução	-	1	5	-	15	15
	Ausente	13	0	3	15	0	6
	<b>Total</b>	<b>22 (30,5%)</b>			<b>51 (70,8%)</b>		
Desfavorável	Aparecimento / Aumento	11	23	16	9	5	2
	Não modificada	-	0	0	-	4	1
	<b>Total</b>	<b>50 (69,5%)</b>			<b>21 (29,2%)</b>		

## DISCUSSÃO

A tomografia computadorizada foi introduzida na Medicina a partir de 1970 (Brenner e Hall, 2007) e sua indicação tem se expandido desde então e o primeiro relato de utilização da tomografia em Endodontia aconteceu em 1989 com a proposta da utilização desta técnica para diferenciar cistos e granulomas periapicais (Trope *et al.*, 1989).

Neste estudo, a utilização da tomografia computadorizada foi proposta para avaliar as regiões apical e periapical em dentes com lesão periapical experimentalmente induzida submetidos a diferentes protocolos clínicos para tratamento de canais radiculares. Embora existam relatos de caso sobre a utilização da tomografia computadorizada para preservação pós-tratamento endodôntico (Cotti *et al.*, 1999), a avaliação experimental com o objetivo de determinar a acurácia deste método nas condições clínicas propostas nesta pesquisa ainda não foi investigado.

Como pôde ser observado pela comparação entre as medidas das áreas das lesões periapicais obtidas pela avaliação radiográfica e pela avaliação tomográfica, as lesões periapicais apresentavam maior extensão méso-distal quando avaliadas pela tomografia computadorizada de feixe cônico do que quando avaliadas pela radiografia, tanto aos 45 dias após a contaminação dos canais radiculares quanto aos 180 dias após a realização do tratamento endodôntico. Aos 180 dias, utilizando a avaliação microscópica como padrão-

ouro, constatou-se que as medidas obtidas pela tomografia computadorizada de feixe cônico eram mais fiés do que aquelas obtidas pela radiografia periapical convencional. Ainda, a sensibilidade e a acurácia da tomografia computadorizada de feixe cônico para detecção de lesões periapical foram superiores à radiografia periapical convencional. Possivelmente isto tenha acontecido devido ao fato de que na radiografia periapical convencional existe sobreposição de estruturas tridimensionais em uma imagem bidimensional, podendo mascarar a real extensão das lesões periapicais. Por outro lado, por meio da tomografia computadorizada de feixe cônico é possível obter uma seqüência de cortes seriados, os quais permitem estabelecer a dimensão real da lesão periapical quando é obtido um corte de espessura fina contendo apenas a região do osso esponjoso (von Stechow *et al.*, 2003; Simon *et al.*, 2006; Cotton *et al.*, 2007; Lofthag-Hansen *et al.*, 2007; Stravopoulos e Wenzel, 2007).

Com o objetivo de padronizar as avaliações e dessa maneira realizar comparações entre os métodos de diagnóstico por imagem, as medidas das lesões periapicais foram realizadas em secções tomográficas e microscópicas obtidas no plano sagital. Na avaliação tomográfica, a maior área radiolúcida encontrada na seqüência de cortes para cada raiz foi utilizada para mensuração sendo na avaliação microscópica utilizada a lâmina que apresentava o maior diâmetro da lesão. O maior diâmetro da lesão periapical têm sido utilizado em avaliações microscópicas prévias como representativo da extensão da reabsorção óssea periapical (De Rossi *et al.*, 2007, 2008). Esta medida pôde ser obtida com fidelidade neste estudo quando foi utilizada a tomografia computadorizada de feixe cônico, possibilitando dessa maneira, a avaliação com sobreposição mínima de estruturas. A superioridade da tomografia computadorizada de feixe cônico na detecção e avaliação da extensão das lesões periapicais demonstrada neste estudo encontram respaldo em trabalhos publicados recentemente que mostraram que lesões periapicais que apresentam diâmetro mesio-distal médio de 2,8 mm não diagnosticadas por meio da radiografia periapical convencional podem ser detectados pela tomografia computadorizada (Lofthag-Hansen *et al.*, 2007). Em outro estudo, durante o desenvolvimento da lesão periapical, o exame radiográfico não permitiu a detecção de áreas radiolúcidas aos 14 dias após a contaminação dos canais radiculares enquanto a tomografia computadorizada permitiu a detecção em 33% dos espécimes. Estas observações foram semelhantes àquelas obtidas aos 21 dias após a contaminação dos canais radiculares, quando lesões periapicais foram detectadas em 47% dos espécimes por meio da radiografia periapical convencional e em 83% por meio da tomografia computadorizada (Jorge *et al.*, 2008). Em dentes submetidos ao

retratamento endodôntico, a superioridade da tomografia computadorizada para detecção de lesões periapicais em relação à radiografia periapical convencional tem sido atribuída a menor possibilidade de obtenção de resultados falso-negativos (Huumonon *et al.*, 2006).

Existem diferentes *scanners* para tomografia computadorizada utilizados em Endodontia, os quais são classificados de acordo com o método de aquisição da imagem em tomografia convencional espiral e tomografia computadorizada de feixe cônico (Patel *et al.*, 2007). Neste estudo foi utilizada a tomografia computadorizada de feixe cônico por ser indicado para avaliação das estruturas dentais e maxilofaciais, uma vez que apresenta menor *field-of-view* e conseqüentemente permite a obtenção de imagens em menor tempo de exposição, menor radiação ao paciente e ainda permite a possibilidade de trabalho por meio de reconstruções tridimensionais (Cotton *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 2007, 2009).

Recentemente foi demonstrado em humanos que a tomografia computadorizada de feixe cônico permite identificar uma maior quantidade de lesões periapicais do que as técnicas radiográficas periapical e panorâmica (Estrela *et al.*, 2008a, 2008b). Entretanto, lesões periapicais em estágio avançado, de acordo com o *Periapical Index*, foram corretamente identificadas por métodos radiográficos convencionais. Ainda, às imagens obtidas pela tomografia computadorizada de feixe cônico foram atribuídos maiores escores do *Periapical Index* do que às imagens radiográficas, corroborando com os resultados deste estudo em que foi possível identificar pela tomografia computadorizada de feixe cônico lesões com maior extensão méso-distal 45 dias após contaminação dos canais radicular ou 180 dias após a realização do tratamento endodôntico do que aquelas obtidas pela radiografia periapical convencional.

Embora em estudo prévio em humanos tenha sido relatado que existe pouca diferença na detecção de lesões periapicais quando se comparou a radiografia à tomografia convencional espiral (Tammisalo *et al.*, 1996), deve-se levar em consideração que naquele estudo foram utilizados cortes tomográficos bastante espessos, de 8 mm de espessura, não eliminando assim a sobreposição de estruturas anatômicas. Com os aparelhos mais modernos, que utilizam o princípio do feixe cônico para tomadas tomográficas, é possível trabalhar com cortes mais finos, com 1 mm de espessura, como realizado em nosso estudo, com o objetivo de eliminar ao máximo a sobreposição de imagens e permitir a detecção de lesões de pequena extensão confinadas ao osso esponjoso.

O valor preditivo negativo para a radiografia periapical convencional neste estudo foi de 0,28 indicando que quando condições de normalidade foram diagnosticadas na região periapical pela radiografia periapical convencional, 72% dos casos apresentavam lesão

periapical pela avaliação microscópica. O valor preditivo negativo do exame radiográfico para detecção de lesões periapicais não é um achado recente, tendo sido relatado variando de 0,53 a 0,67 em outros estudos (Brynmolf, 1967; Rowe e Binnie, 1974; Green *et al.*, 1997; Barthel *et al.*, 2004; Stavropoulos e Wenzel, 2007).

Nossos achados corroboram com os estudos prévios indicando que a radiografia periapical convencional apresenta limitações para diagnosticar a ausência de lesão periapical. O valor preditivo negativo para a tomografia computadorizada de feixe cônico foi quase duas vezes superior ao da radiografia periapical convencional neste estudo, ainda que 7 lesões periapicais tenham sido detectadas pela microscopia, mas não pelos métodos imaginológicos. Dentre as 77 lesões periapicais identificadas pela microscopia, 15 delas eram pequenas e apresentavam o infiltrado inflamatório restrito ao forame apical com reabsorção óssea de pequena extensão. Possivelmente, nestes casos, a perda óssea em volume restrita não possibilitou a detecção pela tomografia computadorizada de feixe cônico. A especificidade e o valor preditivo positivo foram 100% para a tomografia computadorizada de feixe cônico e para a radiografia periapical convencional, indicando que sempre que uma radioluscência periapical era detectada por ambas as técnicas, ela correspondia à presença de inflamação microscopicamente.

Embora um estudo *ex vivo* tenha sido publicado nesta área indicando que a tomografia computadorizada apresenta maior acurácia do que o exame radiográfico para detecção de lesões periapicais artificialmente confeccionadas na mandíbula de porcos (Stavropoulos e Wenzel, 2007), este é o primeiro estudo experimental *in vivo* em que a presença de lesão periapical induzida por bactérias foi avaliada após utilização de diferentes protocolos clínicos para tratamento de canais radiculares. No Grupo 1, o tratamento de canais radiculares foi realizado em dentes com vitalidade pulpar e nos Grupos 2 e 3, o tratamento de canais radiculares foi realizado em dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento em sessão única ou utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora respectivamente.

Na Endodontia existe controvérsia se o tratamento de canais radiculares em dentes com lesão periapical pode ser realizado em sessão única ou se deve ser utilizado um curativo de demora intracanal com o objetivo de reduzir a quantidade de microrganismos no interior do canal radicular não removidos durante o preparo biomecânico e dessa maneira estimular o processo de reparo (Trope *et al.*, 1999; Weiger *et al.*, 2000; Peters e Wesselink, 2002; Bergenholtz e Spangberg, 2004; Gesi *et al.*, 2006).

Nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única (Grupo 2), foram detectados descontinuidade da lâmina dura e presença de áreas radiolúcidas sugestivas de lesão periapical em todos os espécimes tanto pela tomografia computadorizada de feixe cônico, como pelo exame radiográfico periapical quanto pela avaliação histológica. Possivelmente, o fato das lesões apresentarem maior diâmetro neste grupo possibilitou que todos os métodos de diagnóstico detectassem similarmente a presença de lesões periapicais, semelhante ao ocorrido nos dentes com lesão periapical experimentalmente induzida não submetidos ao tratamento endodôntico (Grupo 4). A menor sensibilidade dos métodos imaginológicos nestes grupos, no período experimental de 180 dias, mimetiza os resultados obtidos no período experimental de 45 dias, no qual não foram observadas diferenças entre os métodos de diagnóstico para a detecção das lesões periapicais, uma vez que todas as lesões apresentavam grande extensão méso-distal.

Por outro lado, nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora (Grupo 3), descontinuidade da lâmina dura e presença de áreas radiolúcidas sugestivas de lesão periapical foram detectados em 71,4% das amostras por meio do exame radiográfico periapical, enquanto que a tomografia computadorizada de feixe cônico possibilitou a detecção em todos os espécimes (100%) similarmente à avaliação microscópica. A divergência entre os resultados obtidos pela tomografia computadorizada e pela radiografia periapical convencional, observadas neste grupo, pode ser em função de que as lesões apresentavam menor extensão méso-distal, com grande quantidade de tecido ósseo ao redor, aumentando a sobreposição de estrutura óssea sadia.

Presença de reabsorção radicular externa foi detectada pela tomografia computadorizada de feixe cônico e pelo exame radiográfico periapical convencional em aproximadamente 60% dos casos, após a contaminação dos canais radiculares, sem diferença entre os métodos. Após a obturação dos canais radiculares, a presença de reabsorção radicular externa foi detectada pela tomografia computadorizada de feixe cônico, pelo exame radiográfico periapical convencional e pela avaliação microscópica em aproximadamente 80% dos espécimes com lesão periapical submetidos ao tratamento de canais radiculares em sessão única (Grupo 2). Estes resultados foram diferentes daqueles encontrados nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora (Grupo 3; 60%) e nos dentes com vitalidade pulpar submetidos ao tratamento endodôntico (Grupo 1; 8%), os quais apresentaram menor porcentagem de espécimes com reabsorções radiculares. O aumento

da porcentagem de espécimes com reabsorção radicular, no grupo com lesão periapical experimentalmente induzida não submetidos ao tratamento endodôntico, assim como nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única, indicam que os fatores desencadeantes da lesão periapical e da inflamação periapical não-controlada nestes grupos podem ter sido os responsáveis pelo aumento na ocorrência de reabsorção radicular (Martón e Kiss, 2000; Consolaro, 2005).

A presença de reabsorção radicular externa nas diferentes condições experimentais foi detectada semelhantemente pela tomografia computadorizada de feixe cônico, pelo exame radiográfico periapical convencional e pela avaliação microscópica, sem diferença entre os métodos de detecção. A vantagem da tomografia computadorizada sobre os demais métodos de diagnóstico está relacionada à possibilidade de reconstruir tridimensionalmente as estruturas radiculares (Balto *et al.*, 2002) e, dessa maneira, identificar a morfologia das reabsorções radiculares. Aliado a isto, os altos valores de especificidade e sensibilidade para detecção de reabsorções radiculares externas pela tomografia computadorizada de feixe cônico descritos previamente (Silveira *et al.*, 2007; Liedke *et al.*, 2009; Patel *et al.*, 2009) contribuem para a indicação clínica deste método de imagiologia.

Como ferramenta adicional para diagnóstico e acompanhamento da regressão de lesões periapicais após tratamento endodôntico, a tomografia computadorizada permite a avaliação tridimensional das estruturas. Por meio de *softwares* de reconstrução, como o *Amira Software* utilizado neste estudo, o tamanho da lesão periapical pode ser estimado e o volume obtido pela soma das áreas da superfície da lesão segmentadas em cada corte da tomografia, semelhante ao descrito previamente para o cálculo do volume de alvéolos dentais pós-extração em humanos (Agbaje *et al.*, 2007) ou em lesões periapicais experimentalmente induzidas em camundongos (von Stechow *et al.*, 2003).

Em estudo prévio foi demonstrado que as medidas microscópicas e microtomográficas da área da lesão periapical se correlacionam positivamente, assim como existe uma correlação entre a área e o volume destas lesões detectados por microtomografias (von Stechow *et al.*, 2003). Nosso estudo foi o primeiro realizado na área da Endodontia para avaliar o volume das lesões periapicais pré e pós-tratamento de canais radiculares e para tanto algumas padronizações foram necessárias. A visibilidade da lesão periapical em cada corte depende da orientação dos cortes em relação a orientação espacial das lesões, uma vez que secções em orientações não padronizadas levam a visões diferentes da mesma lesão. Para minimizar os efeitos negativos do examinador na reconstrução das lesões, as imagens obtidas foram posicionadas corretamente e a segmentação dos cortes foi

realizada separadamente em orientação axial, coronal e sagital para evitar o viés ocasionado por uma orientação espacial única.

Por meio da avaliação volumétrica dos tecidos periapicais pela tomografia computadorizada de feixe cônico, dentre as 72 raízes submetidas ao tratamento endodôntico, 50 raízes apresentaram um desfecho desfavorável 180 dias após a obturação dos canais radiculares, o dobro do valor detectado pela avaliação radiográfica periapical convencional. A radiografia periapical convencional mostrou-se pouco confiável para detecção da presença de lesões periapicais assim como para determinar a redução do tamanho das lesões, o que poderia ser especulado pelo fato de que a expansão vestibulo-lingual da lesão periapical no osso esponjoso não ser identificada em vista sagital (Bender e Seltzer, 1961; Bender, 1982; van der Stelt, 1985). Nestas situações, o aumento da lesão somente pode ser revelado por medidas volumétricas como é o caso da tomografia computadorizada (Huomonen e Ørstavik, 2002; Gielkens *et al.*, 2008).

Os desfechos desfavoráveis foram encontrados mais frequentemente nos espécimes submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única do que naqueles em que se utilizou o hidróxido de cálcio como curativo de demora em concordância com outros estudos experimentais publicados (Katebzadeh *et al.*, 1999; Holland *et al.*, 2003; De Rossi *et al.*, 2005; Leonardo *et al.*, 2006; Silveira *et al.*, 2007). Por outro lado, estudos clínicos e radiográficos realizados em humanos para acompanhamento pós-tratamento de canais radiculares têm mostrado que não existe diferença no desfecho do tratamento endodôntico em uma ou duas sessões (Trope *et al.*, 1999; Weiger *et al.*, 2000; Peters e Wesselink, 2002; Sathorn *et al.*, 2005; Figini *et al.*, 2007; Naito *et al.*, 2008), possivelmente em função das limitações de delineamento das pesquisas clínicas, principalmente com relação ao tamanho da amostra e aos métodos utilizados para detecção das lesões periapicais.

O alto índice de desfechos desfavoráveis após o tratamento endodôntico neste estudo pode ser atribuído, em parte, ao curto período de preservação pós-tratamento de canais radiculares (Katebzadeh *et al.*, 1999). Previamente foi demonstrado que, em dentes de cães com lesão periapical visível radiograficamente, 180 dias após a utilização de um curativo de demora a base de hidróxido de cálcio em veículo viscoso (Calen PMCC) e obturação dos canais radiculares com o cimento AH Plus, a área mediana das lesões periapicais determinada pela radiografia periapical convencional era 3,4 mm<sup>2</sup>, semelhante ao relatado neste estudo para o Grupo 3 (2,8 mm<sup>2</sup>), e reduziu consideravelmente aos 360 dias pós-tratamento, para 1,2 mm<sup>2</sup> (Grecca, 1999; Grecca *et al.*, 2001). Outro estudo semelhante demonstrou que após a obturação dos canais radiculares em dentes de cães é

necessário um período de 270 dias para desaparecimento da lesão periapical visível radiograficamente e reestabelecimento da lâmina dura (Leonardo *et al.*, 1994). É importante o fato de que houve menor diâmetro da lesão periapical nos dentes submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora em relação aos dentes obturados em sessão única, evidenciando que a reparação óssea nestes espécimes foi mais avançada que nos demais grupos.

Existem divergências na literatura com relação ao tempo necessário para se estabelecer o sucesso ou fracasso radiográfico após o tratamento endodôntico. Atualmente a Sociedade Européia de Endodontia recomenda o acompanhamento clínico-radiográfico 1 ano após a obturação dos canais radiculares, com avaliação anual por um período de 4 anos, para que seja estabelecido sucesso ou fracasso do tratamento (European Society of Endodontology, 2006). A Associação Americana de Endodontia, por sua vez, recomenda um período mínimo de 4 a 5 anos para preservação do tratamento endodôntico (Ng *et al.*, 2007). Considerando que lesões periapicais confinadas ao osso esponjoso podem não ser visíveis radiograficamente (Huumonen e Ørstavik, 2002; Bender e Seltzer, 1961; Bender, 1982; van der Stelt, 1985; Stabholz *et al.*, 1994; Ricucci e Bergenholtz, 2003; Wu *et al.*, 2006) e, dessa maneira, não serem percebidas durante ou após esse período estabelecido para preservação, por meio de tomografia computadorizada novos períodos poderão ser propostos para indicar o sucesso tomográfico do tratamento de canais radiculares. O fato da tomografia computadorizada ser útil para obtenção de informações a respeito do tamanho real da lesão, bem como da sua relação espacial com diferentes pontos anatômicos, indica que este novo método imagiológico deve ser considerado como uma opção para a preservação do reparo de lesões periapicais pós-tratamento de canais radiculares (Cotti *et al.*, 1999). Outras vantagens da utilização da tomografia computadorizada sobre a radiografia periapical convencional incluem a possibilidade de avaliar a espessura do tecido ósseo em diferentes planos, localizar precisamente o posicionamento do canal mandibular e sua relação com o ápices dentais, a possibilidade de diferenciar os canais radiculares vestibular e lingual por meio do seccionamento coronal do dente e a habilidade para detectar fraturas radiculares verticais em dentes submetidos ou não ao tratamento endodôntico (Tachibana *et al.*, 1990; Kassebaum *et al.*, 1991; Velvart *et al.*, 2001; von Stechow *et al.*, 2003; Nakata *et al.*, 2006; Simon *et al.*, 2006; Cotton *et al.*, 2007; Lofthag-Hansen *et al.*, 2007; Nair e Nair, 2007; Matherne *et al.*, 2008; Hassan *et al.*, 2009).

Nesse sentido, a viabilidade e o custo-benefício do uso da tomografia computadorizada de feixe cônico na rotina prática clínica devem ser avaliados. A dose de



radiação efetiva para um exame radiográfico periapical completo varia de 33 a 84 microsievets ( $\mu\text{SV}$ ) (Gibbs, 2000). A dose efetiva de radiação para a tomografia computadorizada varia de 33,9 a 50,3  $\mu\text{SV}$  (Mah *et al.*, 2003; Scarfe *et al.*, 2006). Dessa maneira, a quantidade de exposição à radiação a que um paciente submetido a tomografia computadorizada de feixe cônico recebe é comparável àquela utilizada no diagnóstico por imagem de rotina (Gibbs, 2000; Scarfe *et al.*, 2006; Cotton *et al.*, 2007).

Neste estudo os canais radiculares de dentes de cães com ou sem lesão periapical experimentalmente induzida foram submetidos ao tratamento endodôntico utilizando diferentes protocolos clínicos e o desfecho do tratamento endodôntico foi avaliado por meio de tomografia computadorizada de feixe cônico, por radiografias periapicais convencionais e pela avaliação histológica dos tecidos. De acordo com os resultados obtidos nestas avaliações podemos concluir que:

- ✓ A tomografia computadorizada de feixe cônico permitiu a detecção de lesões periapicais experimentalmente induzidas em dentes de cães com maior sensibilidade e acurácia do que a radiografia periapical convencional.
- ✓ As lesões periapicais medidas pela tomografia computadorizada de feixe cônico se apresentavam mais extensas no sentido méso-distal do que quando avaliadas pela radiografia periapical convencional e apresentavam maior correlação com as medidas obtidas pela avaliação microscópica.
- ✓ Nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única o desfecho do tratamento de canais radiculares foi considerado desfavorável para a maior parte dos espécimes e caracterizado pela manutenção ou progressão da lesão periapical à semelhança dos dentes com lesão periapical não submetidos ao tratamento endodôntico. Por outro lado, nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora, um maior número de espécimes apresentaram desfechos favoráveis caracterizado pela diminuição ou desaparecimento da lesão periapical.

**CAPÍTULO 2. METALOPROTEINASES DA MATRIZ FORAM ALTAMENTE EXPRESSAS EM LESÕES PERIAPICAIS DE HUMANOS E EM LESÕES EXPERIMENTALMENTE INDUZIDAS EM CÃES. A UTILIZAÇÃO DO HIDRÓXIDO DE CÁLCIO COMO CURATIVO DE DEMORA EM DENTES COM LESÃO PERIAPICAL PROPICIOU UM PROCESSO DE REPARO APICAL E PERIAPICAL MAIS FAVORÁVEL DO QUE O TRATAMENTO ENDODÔNTICO EM SESSÃO ÚNICA**

A lesão periapical representa a resposta imunoinflamatória localizada devido ao aumento do número e progressão de microrganismos advindos dos canais radiculares contaminados em direção aos tecidos apicais e periapicais resultando em reabsorção óssea e dentária (Kawashima e Stashenko, 1999; Martón e Kiss, 2000; Liapatas *et al.*, 2003; Kabak *et al.*, 2005). A reação inflamatória periapical é composta por um infiltrado inflamatório misto, caracterizado pela presença de neutrófilos, linfócitos T e B, plasmócitos e macrófagos, com maior prevalência celular dependendo do estágio da doença (Stashenko e Yu, 1989; Wang e Stashenko, 1993, Yamasaki *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 1999; Liapatas *et al.*, 2003).

Os neutrófilos polimorfonucleares estão presentes na fase inicial do desenvolvimento da lesão periapical, sendo sua função na patogênese da doença conhecida (Yamasaki *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 2002; De-Rossi *et al.*, 2008). A indução de neutropenia em ratos, por uso de Metotrexato, concomitantemente à contaminação dos canais radiculares, inibiu a reabsorção óssea e, portanto, a formação da lesão periapical (Yamasaki *et al.*, 1994). Com a progressão tempo-dependente da lesão periapical, o processo inflamatório se torna crônico e inicia-se o recrutamento de células inflamatórias mononucleadas (Stashenko e Yu, 1989; Martón e Kiss, 2000). A presença de linfócitos T helper (Th) e T citotóxico, tanto nas lesões periapicais de humanos e como naquelas experimentalmente induzidas, foi relatada em estudos prévios (Stashenko e Yu, 1989; Walker *et al.*, 2000; Liapatas *et al.*, 2003; Kawahara *et al.*, 2004; Yamasaki *et al.*, 2006) e a função protetora ou estimuladora desempenhada pelas citocinas produzidas pelos linfócitos Th1 (INF- $\gamma$ ) e Th2 (IL-4 e IL-10) no desenvolvimento da lesão periapical experimental foi demonstrada recentemente (De-Rossi *et al.*, 2008). Ainda, a contaminação dos canais radiculares em ratos leucopênicos levou à menor extensão da reabsorção óssea periapical nestes animais, demonstrando a importância da resposta imune mediada por células no desenvolvimento da lesão (Waterman-Junior *et al.*, 1998).

A importância das bactérias no desenvolvimento da lesão periapical é amplamente

conhecida, após estudo clássico que demonstrou que a exposição pulpar em ratos *germ-free* não levou à formação de lesão periapical, enquanto em animais convencionais houve desenvolvimento da lesão 15 dias após contaminação do tecido pulpar (Kakehashi *et al.*, 1965). Em humanos, nos dentes com lesão periapical visível radiograficamente, as bactérias estão amplamente distribuídas no sistema de canais radiculares e nas lacunas de reabsorção do cimento, seja na forma isolada ou formando extensos biofilmes microbianos (Leonardo *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2008).

A presença de microrganismos, particularmente os anaeróbios gram-negativos, no sistema de canais radiculares e nas lacunas de reabsorção do cimento, pós-tratamento de canais radiculares, é considerada uma das principais causas de persistência da lesão periapical e, portanto, do insucesso do tratamento endodôntico (Nair *et al.*, 1990; Leonardo *et al.*, 1994). Ainda, em modelos experimentais de doença periodontal e lesão periapical, a presença de bactérias estimula a resposta inflamatória local e a produção intensa de proteases que degradam o meio extracelular e facilitam o processo de reabsorção óssea (Garlet *et al.*, 2006; Corotti *et al.*, 2009).

Dentre as proteases responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular estão as metaloproteinases da matriz (MMPs). As MMPs fazem parte de uma família de endopeptidases metal-dependentes as quais são secretadas na forma de pró-enzimas inativas, denominadas zimógenos, e são ativadas no tecido pela segmentação dos pró-peptídeos. Todas as MMPs contêm  $Zn^{++}$  no sítio catalítico e requerem a presença de  $Ca^{++}$  para sua estabilidade e atividade (Bierkedal-Hansen, 1993). Estas proteinases são expressas em resposta a estímulos específicos pelas células residentes do tecido conjuntivo durante o processo de remodelação tecidual, bem como por células inflamatórias que invadem os tecidos durante eventos inflamatórios (Bierkedal-Hansen, 1993; Krane, 1994; Parks *et al.*, 2004).

As metaloproteinases da matriz são classificadas em 5 classes principais de acordo com sua especificidade por determinados substratos e de acordo com a sua homologia estrutural interna em colagenases, gelatinases, estromelisinases, MMPs associadas à membrana e outras (Woessner, 1991; Bierkedal-Hansen, 1993; Krane, 1994). Existem evidências que indicam que as metaloproteinases da matriz são importantes para uma grande variedade de processos biológicos, desde o desenvolvimento e remodelação até a destruição dos tecidos (Hayakawa, 1998; Parks *et al.*, 2004; Hannas *et al.*, 2007; Page-McCaw

*et al.*, 2007). Durante a destruição tecidual na doença periodontal, as metaloproteinases da matriz são consideradas mediadores importantes para a degradação do colágeno (Bierkedal-Hansen, 1993; van der Zee *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 2002; Nishikawa *et al.*, 2002; Rossa-Junior *et al.*, 2005) e, portanto, da perda de inserção do elemento dental (Hernandez *et al.*, 2006; Sorsa *et al.*, 2006).

Durante a reabsorção óssea, a metaloproteinase da matriz-1 (MMP-1) desempenha um importante papel na desorganização do tecido osteóide que recobre os tecidos mineralizados, possibilitando a reabsorção óssea (Birkedal-Hansen, 1993; Woessner, 1991; Lin *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2004). As metaloproteinases da matriz MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 e MMP-13 foram descritas em lesões periapicais de humanos previamente (Teronen *et al.*, 1995a, 1995b; Lin *et al.*, 1997; Shin *et al.*, 2002; Wahlgren *et al.*, 2001, 2002, 2003; Leonardi *et al.*, 2005; Belmar *et al.*, 2008; Carneiro *et al.*, 2009), embora a distribuição e atividade destas enzimas nos tecidos não tenha sido detalhada. Ainda, a investigação abrangente de componentes do meio extracelular específicos de cistos ou granulomas periapicais de humanos pode fornecer informação para diagnóstico diferencial destas lesões. A identificação de biomarcadores específicos de cada forma da doença pode fornecer subsídios para o desenvolvimento de novos métodos visando o diagnóstico clínico de cistos ou granulomas, previamente ao tratamento endodôntico. As metaloproteinases da matriz têm sido descritas em lesões periapicais de humanos, sendo escassa a avaliação comparativa da expressão deste grupo de proteinases em cistos e granulomas periapicais de humanos. Ainda, esta caracterização da expressão de metaloproteinases da matriz é importante no sentido de esclarecer se a lesão periapical experimentalmente induzida em modelos animais representa a resposta inflamatória periapical em humanos.

A concentração de MMP-8 no fluido presente no interior dos canais radiculares, em dentes com necrose pulpar em humanos, pode ser modulada durante tratamento endodôntico (Walgreen *et al.*, 2002), assim como a expressão de RNA mensageiro (RNAm) para MMP-3, -10 e -12 pós-tratamento de canais radiculares em dentes com lesão periapical induzida experimentalmente (Martinez *et al.*, 2007). Estes estudos sugerem que a terapia endodôntica é importante para a redução da inflamação periapical e da expressão de metaloproteinases da matriz. Entretanto, até o presente momento, não existem estudos avaliando a modulação de outras metaloproteinases da matriz pelo tratamento endodôntico.

Considerando a persistência da lesão periapical pós-tratamento de canais radiculares neste estudo, principalmente nos dentes submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única, julgamos oportuno avaliar qual o desfecho histológico e de expressão de metaloproteinases da matriz em dentes submetidos ao tratamento endodôntico utilizando diferentes protocolos clínicos. Com o objetivo de determinar se as metaloproteinases da matriz participam da lesão periapical em humanos, cistos e granulomas periapicais foram avaliados por meio de *microarrays* de DNA, zimografia *in situ* e imunoistoquímica.

## **MATERIAL E MÉTODO**

### **Animais, procedimentos operatórios e processamento histológico**

Após aprovação da projeto de pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de São Paulo – Campus de Ribeirão Preto, processo nº 2007.1.191.53.0 (Anexo B), foram utilizados para pesquisa 15 cães machos, sem raça definida, com 12 meses de idade e pesando, em média, 15 quilogramas. Os procedimentos clínicos realizados e processamento histológico foram descritos no Capítulo 1.

### **Avaliação histológica e histomicrobiológica**

Os tecidos foram corados pela Hematoxilina e Eosina para análise morfológica e contagem de células e pelo Tricrômico de Mallory para avaliação da organização das fibras colágenas no terço apical de cada raiz.

As avaliações quantitativas e semi-quantitativas foram realizadas sob microscopia de luz convencional por um único examinador calibrado sem o conhecimento de qual grupo o espécime pertencia ( $\kappa = 0,89$ ). As células presentes nas regiões apical e periapical foram agrupadas de acordo com suas características morfológicas em células inflamatórias polimorfonucleadas, células inflamatórias mononucleadas e células fibroblásticas. Células fusiformes mononucleadas foram consideradas células fibroblásticas, células mononucleadas com núcleo largo foram classificadas como infiltrado de células inflamatórias mononucleadas e polimorfonucleares leucócitos foram identificados pela morfologia do núcleo multilobulado. O número de células foi estimado em 3 campos representativos de cada corte, sendo utilizados 3 cortes por espécime, no aumento de 100×. Para todas as amostras, a localização destes campos foi padronizada em três orientações ao redor do ápice radicular: na região correspondente ao centro do canal e a 45° do centro do

canal para a direita e para a esquerda (Figura 1.1). O grau de atividade inflamatória, obtido pela razão entre a soma dos componentes do infiltrado inflamatório (mononucleares + polimorfonucleares) sobre a contagem do número de fibroblastos (Kabak *et al.*, 2005), foi calculado com o objetivo de avaliar o processo de reparo nas diferentes condições experimentais.

A presença de selamento biológico apical, definido como a deposição de tecido mineralizado semelhante ao cimento na região do ápice radicular em dentes submetidos ao tratamento endodôntico, foi classificada de acordo com a quantidade de tecido neoformado em: (1) selamento apical completo, (2) selamento apical parcial, (3) ausência de selamento.

A presença ou ausência de fibras do ligamento periodontal reinseridas no cimento apical e o grau de organização tecidual foram analisados pelo Tricrômico de Mallory e categorizados em: (1) ligamento periodontal apical organizado com presença de fibras inseridas no cimento, (2) ligamento periodontal apical levemente desorganizado com perda de inserção linear de até  $\frac{1}{3}$  da extensão do cimento apical, (3) ligamento periodontal apical moderadamente desorganizado com perda de inserção linear maior que  $\frac{1}{3}$  e menor que  $\frac{2}{3}$  da extensão do cimento apical, (4) ligamento periodontal apical severamente desorganizado com perda de inserção linear maior que  $\frac{2}{3}$  da extensão do cimento apical. Os parâmetros avaliados foram adaptados a partir de estudos prévios (Eberhard e Plagmann, 1999; Leonardo *et al.*, 2007).

Para avaliação histomicrobiológica as lâminas foram coradas pelo Método de Brown & Brenn modificado. Os cortes foram desparafinizados, hidratados e imersos em solução de cristal violeta (Ecibra, Cetus Ind. Com. Prod. Quim. Ltda., São Paulo, SP) tamponada com bicarbonato de sódio (Merck S.A. Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, RJ) a 5% por 30 segundos. A seguir, as lâminas foram imersas em solução de iodo por 1 minuto, lavadas em água destilada e imersas em solução de éter-acetona (1 : 1). As lâminas foram lavadas em água destilada e imersas em fucsina básica a 0,25 mg / ml (1 minuto) e posteriormente em ácido pícrico aquoso [2:4:4 Trinitrophenol,  $C_6H_2(OH)(NO_2)_3$ ] (May & Baker Ltd., Inglaterra), por 1 minuto. A seguir foram imersas em acetona p.a. ( $CH_3COCH_3$ , Ecibra) por 15 segundos seguida por imersão rápida em acetona-xilol (1 : 1) e montadas em Permount<sup>®</sup> (Fisher Scientific, Fair Lawn, EUA).

Os microrganismos foram observados em microscopia de luz convencional, com imersão a óleo, no aumento de 100x, nos 2 mm apicais, na luz do canal radicular, nas

ramificações do delta apical e nas lacunas de reabsorção do cimento. Com esta coloração, as bactérias gram-positivas são coradas em azul e as bactérias gram-negativas em roxo ou vermelho. Para cada raiz foram analisados, em média, 15 secções. As lâminas foram avaliadas quanto ao grau de penetração das bactérias, de acordo com os escores: (1) ausência de bactérias, (2) presença de bactérias na luz do canal radicular, (3) presença de bactérias nos túbulos dentinários, (4) presença de bactérias nas lacunas de reabsorção do cimento, (5) presença de bactérias na lesão periapical.

A avaliação microscópica foi realizada por um avaliador que desconhecia o grupo experimental ao qual a amostra pertencia. Os grupos foram comparados com relação à frequência de bactérias por meio do teste exato de Fisher e a presença de microrganismos nas diferentes localizações foi analisada por meio do teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn ( $\alpha = 0,05$ ).

### **Imunoistoquímica**

Com o objetivo de determinar se a destruição tecidual estava associada à maior expressão de metaloproteinases da matriz e a distribuição dessas enzimas nos tecidos, foram realizados ensaios de imunoistoquímica para as metaloproteinases da matriz 1, 2, 8, 9 e 13.

As lâminas foram desparafinizadas, hidratadas em série decrescente de álcoois e mantidas em salina fosfatada tamponada (PBS). A seguir a peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 1,5%, diluído em metanol, por 30 minutos. As lâminas foram lavadas em PBS por 5 minutos (2x) e submetidas à recuperação dos epítomos antigênicos utilizando solução tampão de citrato de sódio (pH 6,0) aquecido a 93°C por 15 minutos. A seguir foram lavadas em PBS por 5 minutos (2x) e os sítios de ligação não-específica foram bloqueados com albumina de soro bovino (Sigma, St Louis, EUA) a 2% por 60 minutos. Os tecidos foram incubados com os anticorpos primários para MMP-1 (5 µg / ml; IM35, Calbiochem, San Diego, EUA), MMP-2 (5 µg / ml; MAB3308, Chemicon, Temecula, EUA), MMP-8 (5 µg / ml; MAB3316, Chemicon), MMP-9 (5 µg / ml; MAB3309, Chemicon) e MMP-13 (5 µg / ml; M4052 Anti MMP-13 Hinge Region, Sigma). A seguir as lâminas foram lavadas e incubadas com anticorpos secundários anti-camundongo ou anti-coelho biotinilados por 1 hora (Goat anti-rabbit IgG e Goat anti-mouse IgG, Biocare Medical, Concord, EUA), lavadas em PBS (2x), e incubadas com estreptavidina conjugada à

*horseradish* peroxidase (4plus Streptavidin-HRP, Biocare Medical) por 20 minutos. 3,3'-Diaminobenzidina (DAB<sub>500</sub> Chromogen System, Biocare Medical) foi utilizada como substrato enzimático por 5 minutos e a seguir as lâminas foram lavadas em PBS (2×), contra-coradas com hematoxilina de Harris por 15 segundos, lavadas com água destilada, desidratadas em concentrações crescentes de álcool e montadas em Permount®. Lâminas-controle foram utilizadas para testar a especificidade da imunomarcação nas quais foi omitido o anticorpo primário e as lâminas foram incubadas com imunoglobulinas G (IgG) obtidas da mesma espécie animal na qual o anticorpo primário correspondente foi produzido (Normal Mouse IgG e Normal Rabbit IgG, Calbiochem).

Para cada proteína avaliada foi contado o número total de células, em três campos representativos no aumento de 100×, e a porcentagem de células positivamente marcadas foi calculado. Os dados obtidos foram analisados por meio do teste ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

### **Coleta de cistos e granulomas periapicais de humanos**

Com o objetivo de confirmar se as metaloproteinases da matriz estão envolvidas nas lesões periapicais em humanos, amostras de cistos e granulomas periapicais foram obtidas e utilizadas para investiga o. Após aprova o pela Comissão de  tica da Universidade de Michigan processo n  HUM00017046 (Anexo C) foram selecionados 10 cistos periapicais e 10 granulomas de humanos de arquivos do Serviço de Biópsia e Patologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de Michigan, os quais haviam sido previamente fixados em formol tamponado a 10%, embebidos em parafina, e seccionados com uma espessura de 5  $\mu\text{m}$ . Tecidos do ligamento periodontal obtidos de doadores saudáveis foram usados como controle (n = 5).

A sele o dos espécimes foi realizada por uma patologista, após avalia o de lâminas coradas pela Hematoxilina e Eosina, contendo tecidos periapicais de dentes sem vitalidade pulpar. Cistos periapicais foram selecionados quando apresentavam um tecido granulomatoso ao redor de uma nítida cavidade circundada por um epitel o escamoso estratificado. Granulomas periapicais foram selecionados quando apresentavam um tecido granulomatoso sem a presença de tecidos epitelial ao redor da lesão (Nair *et al.*, 1996; Nair, 1998; Vier e Figueiredo, 2002).



### **Extração de RNA e análise de *microarray***

Os tecidos embebidos em parafina foram transferidos para um tubo tipo *ependorf* de 1,5 ml e desparafinizados em xilol a 50°C por 3 minutos. A seguir foram lavados em etanol absoluto (2×) e expostos a digestão enzimática por meio de protease K (Proteinase K, Qiagen Inc., Valencia, EUA) a 50°C por 3 horas. Para extração do RNA total, os tecidos foram imersos em reagente Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen Corporation, Carlsbad, EUA), seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante, na proporção de 1 ml de Trizol para cada 1 mg de tecido, sendo agitado por 30 segundos e mantido à temperatura ambiente por 5 minutos. Para cada 1 ml da suspensão foi adicionado 0,2 ml de clorofórmio (Sigma), sendo as amostras centrifugadas a 12.000 g a 4°C por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo, ao qual foi adicionado o mesmo volume de isopropanol, sofrendo agitação em *vortex* e incubado por 20 minutos a -20°C para precipitar o RNA da fase aquosa. Novamente os tubos foram centrifugados a 12.000 g por 15 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado em etanol absoluto e posteriormente seco à temperatura ambiente. As amostras de RNA foram suspensas em 50 µl de água deionizada e livre de RNase, sendo então purificadas utilizando o RNEasy Micro Kit (Qiagen Inc.). A qualidade e concentração do RNA isolado foi avaliada por meio de um *chip* de eletroforese (RNA 6000 Pico LabChip; Agilent 2100 BioAnalyzer, Agilent Technologies Inc, Santa Clara, EUA).

A análise global da expressão de RNAm para moléculas do meio extracelular foi realizada por meio de um *microarray* de cDNA (Oligo GEArray<sup>®</sup> DNA Microarray, Human Extracellular Matrix and Adhesion Molecules; SuperArray Bioscience Corporation, Frederick, EUA). O *microarray* de cDNA compreendia 113 genes, agrupados de acordo com sua função, em constituintes da membrana basal, constituintes estruturais do meio extracelular e proteínas colagênicas, proteases e inibidores de proteases extracelulares, proteínas transmembrana, proteínas de adesão intercelular e adesão celular à matriz e outras proteínas de adesão (Tabela 2.1). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado por meio de uma reação de transcrição reversa, na qual 10 µg de RNA total foram utilizados para gerar sondas de cDNA marcadas com biotina-16-dUTP. As sondas de cDNA foram desnaturadas e hibridizadas a 60°C com as membranas do *microarray*, por 12 horas, e reveladas por quimioluminescência, utilizando a fosfatase alcalina conjugada a estreptavidina como enzima de revelação e CPD-Star<sup>®</sup> como substrato enzimático. A expressão gênica foi avaliada por meio de análise densitométrica dos pontos de quimioluminescência nas membranas

utilizando o programa Image J 1.28 u (National Institutes of Health, Bethesda, EUA). A comparação da expressão gênica entre os grupos foi realizada após normalização pela expressão do *housekeeping*  $\beta$ -actina. Os grupos foram comparados entre si por meio do teste ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

### **Zimografia *in situ***

As metaloproteinases da matriz são sintetizadas e secretadas na forma latente e precisam ser clivadas para se tornarem ativas e exercer sua função. A avaliação da presença e a localização das formas ativas das metaloproteinases da matriz foi realizada por meio da zimografia *in situ* nos tecidos periapicais de humanos. Nos dentes dos animais não foi possível realizar o procedimento, uma vez que as peças foram desmineralizadas por longo período em ácido etilenodiaminotetracético, um agente quelante que inibe a atividade enzimática.

No procedimento da zimografia *in situ*, um substrato específico para determinadas proteases é depositado sobre um tecido e durante o período de incubação o substrato será degradado de modo tempo- e dose-dependente, por enzimas em sua localização nativa. Após a lise do substrato marcado por radioisótopos ou fluoróforos, os produtos da degradação podem ser detectados por radiografias ou microscopia de fluorescência, respectivamente. A natureza do substrato determina a protease a ser identificada (Yan e Blomme, 2003; Frederiks e Mook, 2004; Snoek-van Beurden e Von den Hoff, 2005; Lombard *et al.*, 2005).

As secções com 5  $\mu$ m de espessura foram imersas em borohidreto de sódio (1 mg / ml; Sigma) por 15 minutos (3 $\times$ ), lavadas em PBS e incubadas com um substrato gelatinoso ligado ao isotiocianato de fluoresceína (DQ<sup>TM</sup> Gelatin, Molecular Probes, Eugene, EUA) dissolvido em agarose (0,1 mg / ml; Sigma), por 3 horas, a 37°C, em uma câmara escura humidificada. Os núcleos celulares foram corados pela marcação do DNA por 4'-6-diamidino-2-fenilindole (DAPI; 0,5  $\mu$ g / ml) adicionado ao meio de incubação. Lâminas-controle foram pré-incubadas em ácido etilenodiaminotetracético a 20 mM (EDTA, Sigma) por 1 hora e o EDTA foi adicionado ao meio de incubação. A quantificação da atividade gelatinolítica nas lâminas foi medida pela contagem do número de *spots* de fluorescência nas secções, em áreas representativas, no aumento de 40 $\times$ , e expressas como o número de *spots* de fluorescência por mm<sup>2</sup>. Os grupos foram comparados por meio do teste ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

**Tabela 2.1.** Genes presentes no *microarray* de cDNA para moléculas de adesão e constituintes do meio extracelular (Oligo GEArray Human Extracellular Matrix and Adhesion Molecules

Microarray)

Proteínas da matriz extracelular	
Constituintes da membrana basal	
Colágeno, tipo IV, $\alpha 2$	Laminina, $\alpha 1$
Colágeno, tipo IV, $\alpha 3$	Laminina, $\beta 2$
Colágeno, tipo IV, $\alpha 6$	Laminina, $\beta 3$
Colágeno, tipo VII, $\alpha 1$	Laminina, $\gamma 1$
Colágeno, tipo VIII, $\alpha 2$	Osteonectina
Colágeno e constituintes estruturais do meio extracelular	
Colágeno, tipo XI, $\alpha 1$	Colágeno, tipo VI, $\alpha 3$
Colágeno, tipo XI, $\alpha 2$	Colágeno, tipo VII, $\alpha 1$
Colágeno, tipo XII, $\alpha 1$	Colágeno, tipo IX, $\alpha 1$
Colágeno, tipo XIV, $\alpha 1$	Colágeno, tipo VIII, $\alpha 1$
Colágeno, tipo XV, $\alpha 1$	Colágeno, tipo VIII, $\alpha 2$
Colágeno, tipo XVI, $\alpha 1$	Fibronectina 1
Colágeno, tipo XIII, $\alpha 1$	Seqüência da síndrome de Kallmann 1
Colágeno, tipo XIX, $\alpha 1$	Laminina, $\alpha 4$
Colágeno, tipo I, $\alpha 1$	
Proteases extracelulares	
ADAM metalopeptidase t.1, m.1	Metalo proteinase da matriz 14
ADAM metalopeptidase t.1, m.13	Metalo proteinase da matriz 8
ADAM metalopeptidase t.1, m.8	Metalo proteinase da matriz 9
Metalo proteinase da matriz 1	Metalo proteinase da matriz 16
Metalo proteinase da matriz 10	Metalo proteinase da matriz 17
Metalo proteinase da matriz 11	Metalo proteinase da matriz 2
Metalo proteinase da matriz 12	Paraplegia espástica 7
Metalo proteinase da matriz 13	Inibidor de metalo proteinase (TIMP 1)
Inibidores de proteases extracelulares	
Colágeno, tipo IV, $\alpha 3$	Seqüência da síndrome de Kallmann 1
Colágeno, tipo VI, $\alpha 3$	Osteonectina
Colágeno, tipo VII, $\alpha 1$	Trombospondina 1
Outras moléculas do meio extracelular	
Versican	Osteopontina
Fator de crescimento do tecido conjuntivo	Fator de crescimento transformador $\beta$
Proteína da matriz extracelular 1	Trombospondina 2
Ácido hialurônico sintase 1	Trombospondina 3
Trombospondina 4	Vitronectina
	Laminina, $\beta 4$
<b>Moléculas de adesão celular</b>	
Proteínas transmembrana	
CD44	Integrina, $\alpha L$
E-caderina	Integrina, $\alpha M$
Ácido hialurônico sintase 1	Integrina, $\alpha V$
Moléculas de adesão celular	
Proteínas transmembrana	
CD54	Integrina, $\beta 1$
Integrina, $\alpha 1$	Integrina, $\beta 2$
Integrina, $\alpha 2$	Integrina, $\beta 3$
Integrina, $\alpha 2b$	Integrina, $\beta 4$
Integrina, $\alpha 3$ (antigen CD49C, $\alpha 3$ )	Integrina, $\beta 5$
Integrina, $\alpha 4$	Integrina, $\beta 6$
Integrina, $\alpha 5$	Integrina, $\beta 7$
Integrina, $\alpha 6$	Integrina, $\beta 8$
Integrina, $\alpha 7$	Metalo proteinase da matriz 14
Integrina, $\alpha 8$	Metalo proteinase da matriz 15
Adesão intercelular	
E-caderina	Colágeno, tipo VIII, $\alpha 2$
CD44	Colágeno, tipo XIX, $\alpha 1$
Colágeno, tipo XI, $\alpha 1$	Catenina, $\Delta 1$
Colágeno, tipo VI, $\alpha 2$	Integrina, $\alpha 8$
Adesão célula à matriz extracelular	
ADAM metalopeptidase t.1, m.13	Integrina, $\alpha 8$
CD44	Integrina, $\alpha 9$
Integrina, $\alpha 1$	Integrina, $\alpha 10$
Integrina, $\alpha 2$	Integrina, $\alpha 11$
Integrina, $\alpha 2b$	Integrina, $\alpha L$
Integrina, $\alpha 3$	Integrina, $\alpha M$
Integrina, $\alpha 4$	Integrina, $\alpha V$
Integrina, $\alpha 5$	Integrina, $\alpha X$
Integrina, $\alpha 6$	Integrina, $\beta 1$
Integrina, $\alpha 7$	Integrina, $\beta 2$
Outras moléculas de adesão	
Contractina 1	Colágeno, tipo VI, $\alpha 3$
Colágeno, tipo XI, $\alpha 2$	Colágeno, tipo VII, $\alpha 1$
Colágeno, tipo XII, $\alpha 1$	Colágeno, tipo VIII, $\alpha 1$
Colágeno, tipo XV, $\alpha 1$	Fator de crescimento do tecido conjuntivo
Colágeno, tipo XVI, $\alpha 1$	Catenina, $\alpha 1$
Colágeno, tipo XVIII, $\alpha 1$	Catenina, $\beta 1$
Colágeno, tipo XXIV, $\alpha 1$	Catenina, $\Delta 2$
Colágeno, tipo XXVII, $\alpha 1$	Fibronectina 1
Colágeno, tipo IV, $\alpha 3$	Seqüência da síndrome de Kallmann 1
Colágeno, tipo IV, $\alpha 6$	Laminina, $\alpha 1$
Colágeno, tipo V, $\alpha 1$	Laminina, $\alpha 2$
Colágeno, tipo V, $\alpha 3$	Laminina, $\alpha 3$
Colágeno, tipo VI, $\alpha 1$	Laminina, $\alpha 4$
Colágeno, tipo IX, $\alpha 1$	Versican

Molécula de adesão neuronal 1	Antígeno CD31
Selectina E	Selectina L
Selectina P	Sarcoglicano Ipsiion
Paraplegia espástica 7	Paraplegia espástica 7
Molécula de adesão vascular 1	

Molécula de adesão intercelular 1	
Molécula de adesão vascular 1	

Integrina, $\beta 3$	
Integrina, $\beta 4$	
Integrina, $\beta 5$	
Integrina, $\beta 6$	
Integrina, $\beta 7$	
Integrina, $\beta 8$	
Sarcoglicano, Ipsiion	
Osteopontina	
Trombospondina 3	

Laminina, $\alpha 5$	
Laminina, $\beta 1$	
Laminina, $\beta 2$	
Laminina, $\beta 3$	
Laminina, $\gamma 1$	
Osteonectina	
Trombospondina 1	
Trombospondina 2	
Trombospondina 4	
Tetranectina	
Tenascina C	
Vitronectina	

Metalo proteinase da matriz 16	
Metalo proteinase da matriz 17	
Metalo proteinase da matriz 24	

## RESULTADOS

### ***O tratamento endodôntico em dentes com lesão periapical utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora permitiu o reparo apical e periapical, diferentemente do tratamento endodôntico em sessão única***

O tipo celular mais comumente encontrado nas lesões periapicais em dentes com lesão periapical experimentalmente induzida e não submetidos ao tratamento endodôntico foram as células inflamatórias mononucleadas seguidas pelos fibroblastos e polimorfonucleares neutrófilos. Nos dentes submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora havia menor porcentagem de células inflamatórias (mononucleares + polimorfonucleares) do que nos dentes submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única ( $p < 0,05$ ). Ainda, a porcentagem de fibroblastos foi maior nos dentes submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio do que naqueles submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única ou naqueles dentes com lesão periapical não submetidos ao tratamento endodôntico ( $p < 0,05$ ).

Os dentes com vitalidade pulpar submetidos ao tratamento endodôntico apresentaram alta porcentagem de fibroblastos e menor porcentagem de células inflamatórias. Dentes com vitalidade pulpar não submetidos ao tratamento endodôntico apresentavam o ligamento periodontal apical íntegro, composto predominantemente por fibroblastos com ocasional presença de células inflamatórias mononucleadas. O grau de atividade inflamatória, obtido pela razão entre a soma dos componentes do infiltrado inflamatório (mononucleares + polimorfonucleares) sobre a contagem do número de fibroblastos, foi maior nos dentes com lesão periapical não submetidos ao tratamento endodôntico ou submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única do que naqueles dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora ( $p < 0,05$ ). Os dentes com vitalidade pulpar, submetidos ou não ao tratamento endodôntico apresentaram menor atividade inflamatória (Tabela 2.2; Figura 2.1).

**Tabela 2.2.** Caracterização dos tipos celulares presentes na região periapical de dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico utilizando diferentes protocolos clínicos, 180 dias após a obturação dos canais radiculares. As células foram agrupadas em células inflamatórias mononucleadas, células inflamatórias polimorfonucleares e células fibroblásticas. O índice da atividade inflamatória foi calculado com base na razão entre a soma das células inflamatórias mononucleadas e polimorfonucleares sobre o número de células fibroblásticas

Tipo celular	Grupos experimentais				
	Grupo 1 (n = 24)	Grupo 2 (n = 18)	Grupo 3 (n = 21)	Grupo 4 (n = 20)	Grupo 5 (n = 24)
Polimorfonucleares	1,2 ± 0,9	9,6 ± 6,6	4,3 ± 3,2	9,5 ± 2,4	0,17 ± 0,7
Mononucleares	36,7 ± 9,8	59,5 ± 9,1	48,7 ± 9,5	61,7 ± 4,8	13,94 ± 7,6
Fibroblastos	62,1 ± 9,6	30,9 ± 4,4	46,9 ± 11,2	28,7 ± 3,8	85,88 ± 7,6
Índice da atividade inflamatória	0,68	2,31	1,23	2,53	0,17

A presença de selamento biológico no ápice radicular foi observada nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora e nos dentes com vitalidade pulpar submetidos ao tratamento endodôntico, diferentemente dos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única ou nos dentes com lesão periapical não submetidos ao tratamento endodôntico ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2.3).

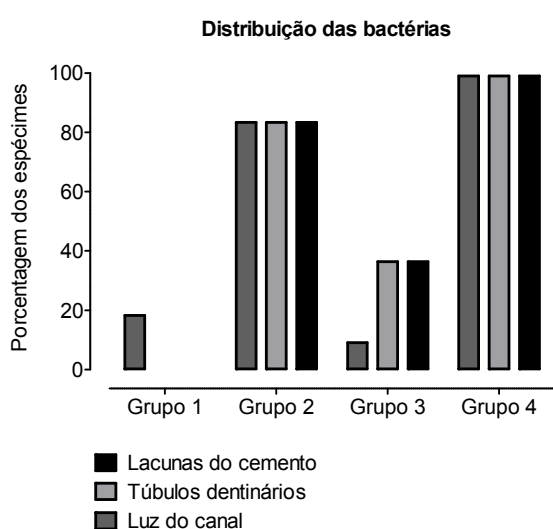
**Tabela 2.3.** Avaliação microscópica realizada 180 dias após a obturação dos canais radiculares em dentes de cães portadores ou não de lesão periapical e submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única ou após utilização do hidróxido de cálcio como curativo de demora. Foram avaliados aspectos relacionados à presença de selamento biológico no ápice radicular. Os valores encontram-se expressos em número de raízes e porcentagem.

Selamento biológico apical	Grupos Experimentais			
	Grupo 1 (n = 24)	Grupo 2 (n = 18)	Grupo 3 (n = 21)	Grupo 4 (n = 20)
<b>1</b> Selamento completo	10 (41,6%)	1 (5,5%)	15 (71,4%)	0
<b>2</b> Selamento parcial	10 (41,8%)	2 (11,1%)	2 (9,5%)	0
<b>3</b> Ausente	4 (16,6%)	15 (83,4%)	4 (19,1%)	20 (100%)

**Os resultados histopatológicos mais favoráveis observados com o hidróxido de cálcio estão relacionados a menor porcentagem de canais radiculares contaminados**

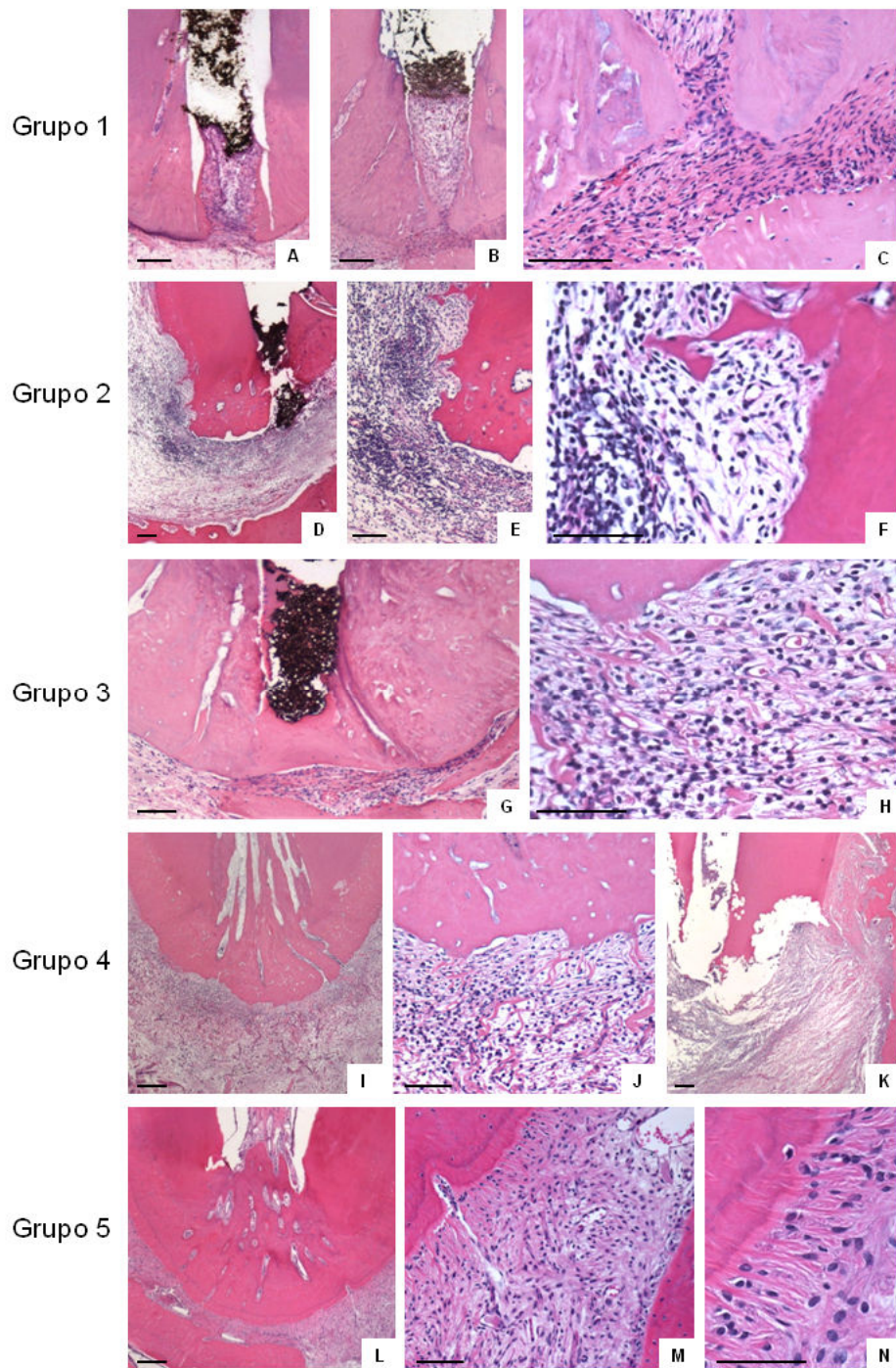
Todos os dentes com lesão periapical não submetidos ao tratamento endodôntico apresentaram microrganismos no sistema de canais radiculares e nas lacunas de reabsorção do cimento apical. Os dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora apresentaram menor frequência de espécimes com bactérias, comparado aos dentes submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única (42,85% *versus* 83,33%, respectivamente;  $p = 0,001$ ). Por outro lado, os dentes com vitalidade pulpar submetidos ao tratamento endodôntico apresentaram menor frequência de espécimes com bactérias se comparados aos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico tanto em sessão única ou utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora (18,75% *versus* 83,33% ou 42,85%, respectivamente;  $p < 0,001$ ).

Nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única, na maior parte dos espécimes as bactérias estavam presentes na luz do canal principal, nos túbulos dentinários e nas lacunas de reabsorção do cimento, diferentemente dos espécimes submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora, nos quais na maior parte dos espécimes não foram detectadas bactérias ( $p = 0,014$ ). Quando foram detectadas bactérias, estas se encontravam distribuídas na luz do canal principal, nos túbulos dentinários e nas lacunas de reabsorção do cimento (Figuras 2.2 e 2.3).



**Figura 2.2.** Distribuição das bactérias no sistema de canais radiculares em dentes de cães submetidos ou não ao tratamento endodôntico. Grupo 1- tratamento endodôntico em dentes com vitalidade pulpar, Grupo 2- tratamento endodôntico em dentes com lesão periapical em sessão única, Grupo 3- tratamento endodôntico em dentes com lesão periapical utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora e Grupo 4- lesão periapical sem tratamento.

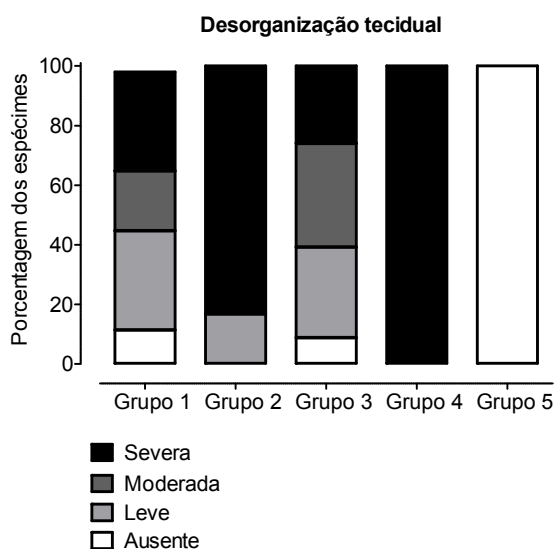
**Figura 2.1.** Fotomicrografias obtidas 180 dias após o tratamento endodôntico. **(A, B, C)** Grupo 1 (tratamento endodôntico em dentes com vitalidade pulpar) – presença de tecido mineralizado selando parcialmente a abertura foraminal. Maior aumento mostrando a integridade da área do ligamento periodontal e tecido ósseo. **(D, E, F)** Grupo 2 (tratamento endodôntico em dentes com lesão periapical em sessão única) – presença de um infiltrado inflamatório intenso na região periapical com reabsorção de tecido ósseo e cimento, ausência de selamento biológico. **(G, H)** Grupo 3 (tratamento endodôntico em dentes com lesão periapical utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora) – presença de tecido mineralizado selando completamente a abertura foraminal e ausência de reação inflamatória periapical. Lateralmente à abertura apical pode ser observado moderado infiltrado inflamatório. **(I, J, K)** Grupo 4 (lesão periapical sem tratamento) - presença de reação inflamatória periapical caracterizada por reabsorção dentária e óssea. Presença de pequenos vasos neoformados e desorganização tecidual. **(L, M, N)** Grupo 5 (dentes com vitalidade pulpar não submetidos ao tratamento endodôntico) – área periapical sadia caracterizada pela ausência de células inflamatórias e presença de ligamento periodontal em condições de normalidade. Presença de fibroblastos, cementoblastos e fibras de Sharpey inseridas no cimento. Barra = 100 µm.





***A desorganização do meio extracelular está associada à contaminação dos canais radiculares e maior expressão de metaloproteínas da matriz na região periapical***

Dentes com lesão periapical não submetidos ao tratamento endodôntico apresentaram severa desorganização do tecido conjuntivo na região do ligamento periodontal apical e ausência de fibras de Sharpey inseridas no cimento radicular. Nos dentes submetidos ao tratamento endodôntico, naqueles em que foi utilizado o hidróxido de cálcio como curativo de demora, desorganização tecidual leve a moderada pôde ser observada, enquanto aqueles submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única, apresentaram destruição tecidual variando de moderada a severa ( $p = 0,003$ ). Do mesmo modo, maior frequência de espécimes com fibras de Sharpey reins inseridas no cimento radicular foram observadas nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora em comparação àqueles submetidos ao tratamento em sessão única ( $p = 0,037$ ). O grau de desorganização tecidual e inserção de fibras no terço apical nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora foi semelhante àqueles dentes com vitalidade pulpar submetidos ao tratamento endodôntico ( $p > 0,05$ ). O grau de destruição tecidual em dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única foi similar àquele observado nos dentes com lesão periapical não submetidos ao tratamento endodôntico ( $p > 0,05$ ) (Figuras 2.3 e 2.4). A presença de bactérias estava associada à severidade da destruição tecidual ( $p < 0,0001$ ).

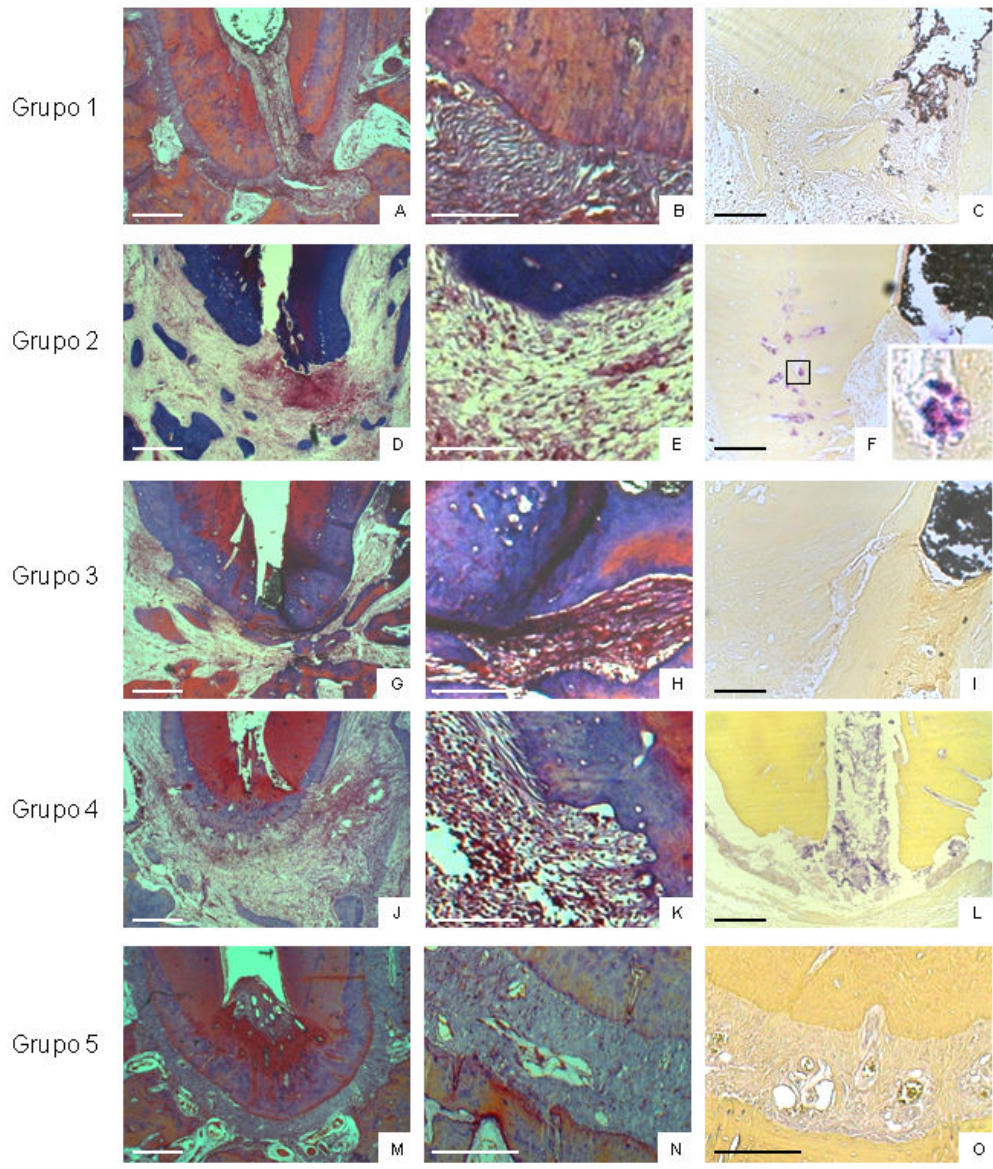


**Figura 2.4.** Desorganização tecidual no terço apical em dentes de cães submetidos ou não ao tratamento endodôntico. Grupo 1- tratamento endodôntico em dentes com vitalidade pulpar, Grupo 2- tratamento endodôntico em dentes com lesão periapical em sessão única, Grupo 3- tratamento endodôntico em dentes com lesão periapical utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora, Grupo 4- dentes com lesão periapical sem tratamento e Grupo 5- dentes com vitalidade pulpar sem tratamento.

**Figura 2.3.** Fibras colágenas foram coradas pelo Tricrômico de Mallory para avaliar o grau de desorganização da matriz extracelular em dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico utilizando diferentes protocolos clínicos. A coloração pelo Método de Brown & Breen Modificado indicou a presença de bactérias. Grupo 1- tratamento endodôntico em dentes com vitalidade pulpar (**A, B, C**), Grupo 2- tratamento endodôntico em dentes com lesão periapical em sessão única (**D, E, F**), Grupo 3- tratamento endodôntico em dentes com lesão periapical utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora (**G, H, I**), Grupo 4- lesão periapical sem tratamento (**J, K, L**) e Grupo 5- dentes com vitalidade pulpar não submetidos ao tratamento endodôntico (**M, N, O**). Barra = 500  $\mu\text{m}$  (**A, D, G, J, M**), 100  $\mu\text{m}$  (**B, C, E, F, H, I, K, L, N, O**).

Tricrômico de Mallory

Brown & Brenn



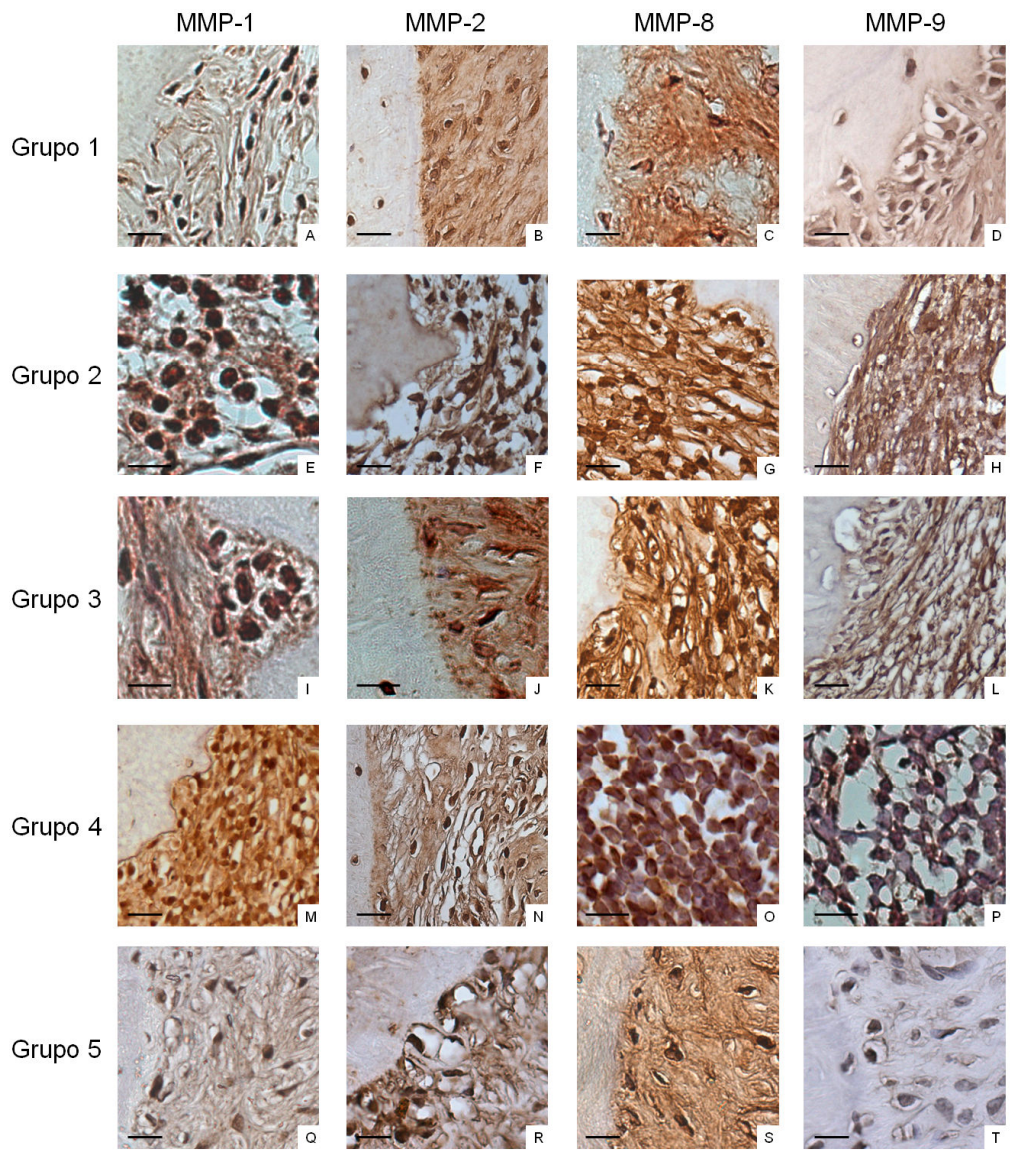
Uma vez que a severidade da desorganização tecidual em dentes com lesão periapical estava associada à presença de bactérias, os tecidos foram imunomarcados para avaliar a expressão de metaloproteinases da matriz nas diferentes condições experimentais, pois estas enzimas são estimuladas em processos inflamatórios periapicais (Teronen *et al.*, 1995a, 1995b; Lin *et al.*, 1997; Shin *et al.*, 2002; Wahlgren *et al.*, 2001, 2002, 2003; Leonardi *et al.*, 2005; Belmar *et al.*, 2008; Carneiro *et al.*, 2009).

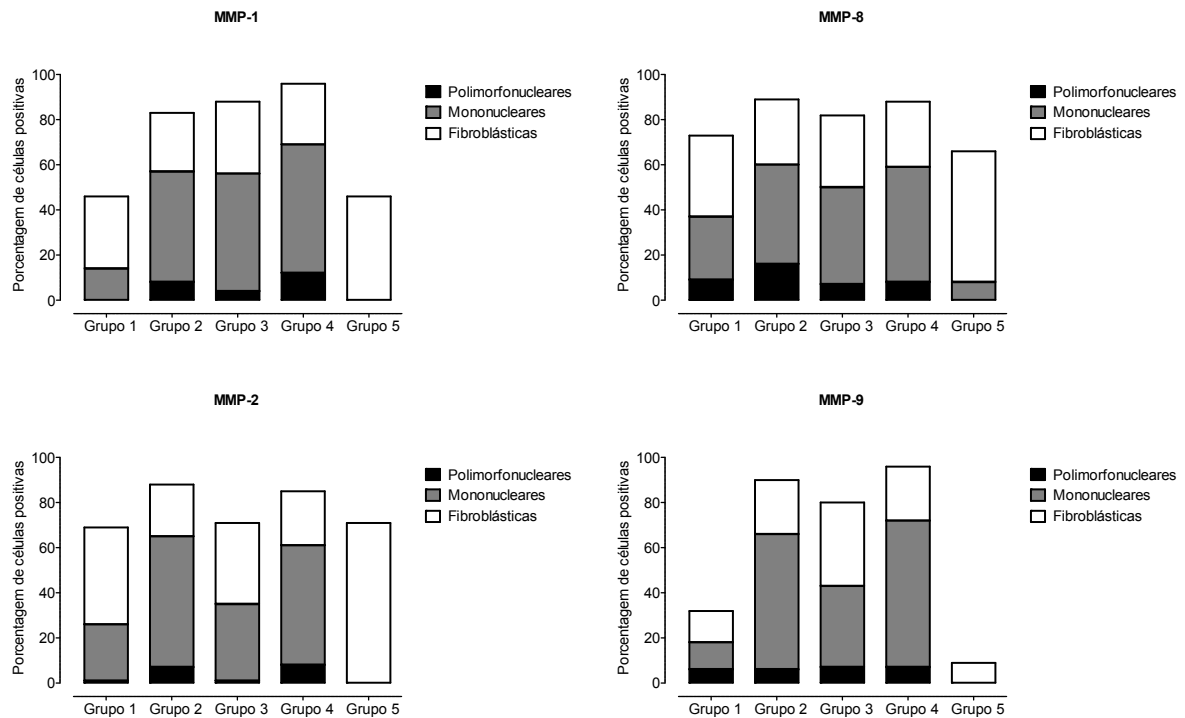
Alta porcentagem de células positivamente coradas para MMP-1, MMP-2, MMP-8 e MMP-9 foram observadas em lesões periapical sem tratamento. Para o anticorpo anti-MMP-13 não foi possível obter marcações positivas nos tecidos periapicais obtidos de cães e, portanto, a avaliação desta metaloproteinase da matriz não foi realizada. Em dentes submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora foi observada menor porcentagem de células coradas, em comparação com os dentes submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única ( $p < 0,03$ ). O tratamento de canais radiculares em dentes com vitalidade pulpar estimulou a expressão de metaloproteinases da matriz, similar à expressão basal observada no ligamento periodontal em dentes sem lesão periapical não submetidos ao tratamento endodôntico ( $p > 0,05$ ), embora as metaloproteinases fossem produzidas por tipos celulares distintos (Figuras 2.5 e 2.6).

MMP-1, MMP-2, MMP-8 e MMP-9 foram preferencialmente expressas por células inflamatórias mononucleadas e fibroblastos, com baixa detecção em neutrófilos polimorfonucleares. Mais de 50% dos fibroblastos expressavam MMP-1, MMP-2 e MMP-8 em dentes com vitalidade pulpar não submetidos ao tratamento endodôntico, enquanto MMP-9 foi fracamente marcada no ligamento periodontal de dentes sadios.

Nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única, as células inflamatórias mononucleadas foram as principais responsáveis pela expressão de metaloproteinases da matriz. Em dentes com lesão periapical nos quais o tratamento endodôntico foi realizado utilizando o curativo de demora à base de hidróxido de cálcio, a expressão de MMP-2, MMP-8 e MMP-9 foi similar em células inflamatórias mononucleadas ou fibroblastos e em menor proporção do que nos dentes submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única ( $p < 0,01$ ). MMP-1 foi similarmente expressa nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico, embora em menor porcentagem de células do que nos dentes com lesão periapical não submetidos ao tratamento endodôntico (Figura 2.6).

**Figura 2.5.** Imunoistoquímica para MMP-1, MMP-2, MMP-8 e MMP-9 foi realizada para avaliar o perfil de metaloproteinases da matriz expressas em dentes com lesão periapical submetidos ou não a diferentes protocolos clínicos para tratamento endodôntico. Grupo 1- tratamento endodôntico em dentes com vitalidade pulpar (**A-D**), Grupo 2- tratamento endodôntico em dentes com lesão periapical em sessão única (**E-H**), Grupo 3- tratamento endodôntico em dentes com lesão periapical utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora (**I-L**), Grupo 4- dentes com lesão periapical sem tratamento (**M-P**) e Grupo 5- dentes com vitalidade pulpar sem tratamento (**Q-T**). Barra= 15 µm.





**Figura 2.6.** Metaloproteínas da matriz são diferentemente expressas por componentes celulares distintos nas lesões periapicais. A quantificação das células positivas foi realizada agrupando os componentes celulares em polimorfonucleares neutrófilos, células inflamatórias mononucleadas ou fibroblásticas. A porcentagem de células expressando MMP-1, MMP-2, MMP-8 e MMP-9 foi estimada em relação a quantidade total de células, por campo de visão, em três áreas representativas. Grupo 1- tratamento endodôntico em dentes com vitalidade pulpar, Grupo 2- tratamento endodôntico em dentes com lesão periapical em sessão única, Grupo 3- tratamento endodôntico em dentes com lesão periapical utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora, Grupo 4- dentes com lesão periapical sem tratamento e Grupo 5- dentes com vitalidade pulpar sem tratamento.

***Os granulomas periapicais obtidos de humanos apresentam maior porcentagem de polimorfonucleares neutrófilos do que os cistos***

Com o objetivo de conhecer as características da lesão periapical em humanos, os componentes do infiltrado inflamatório foram avaliados por meio de microscopia de luz convencional. As células mais prevalentes encontradas em ambos, cistos e granulomas, foram os linfócitos, macrófagos e plasmócitos (infiltrado inflamatório de células mononucleadas;  $59,87\% \pm 19,8$  versus  $43,1\% \pm 3,8$ , respectivamente;  $p > 0,05$ ). Quantidades semelhantes de células semelhantes a fibroblastos foram observadas nos dois tipos de lesão

periapical ( $24,1\% \pm 8,4$  em cistos *versus*  $24,6\% \pm 4,0$  em granulomas). Com relação aos polimorfonucleares neutrófilos, estes foram mais prevalentes nos granulomas periapicais comparado ao cistos ( $32,1 \pm 5,8\%$  *versus*  $15,9\% \pm 7,5$  respectivamente;  $p = 0,0072$ ). O grau de atividade inflamatória, medido pela razão entre os componentes inflamatórios celulares e o componente fibroblástico, foi similar em cistos e granulomas (3,2 e 3,3 respectivamente), embora a composição do infiltrado inflamatório tenha sido diferente, com maior prevalência de polimorfonucleares neutrófilos em granulomas. Os cistos periapicais apresentavam um epitélio estratificado escamoso próximo ao lúmen da lesão e células semelhantes a fibroblastos foram observadas no estroma e ao redor das lesões. Nos granulomas periapicais, fibroblastos estavam distribuídos por toda lesão, entretanto nenhuma camada de células epiteliais estava evidente.

***A expressão de genes que codificam os componentes da matriz extracelular em granulomas e cistos periapicais é diferente da expressão gênica no ligamento periodontal sadio***

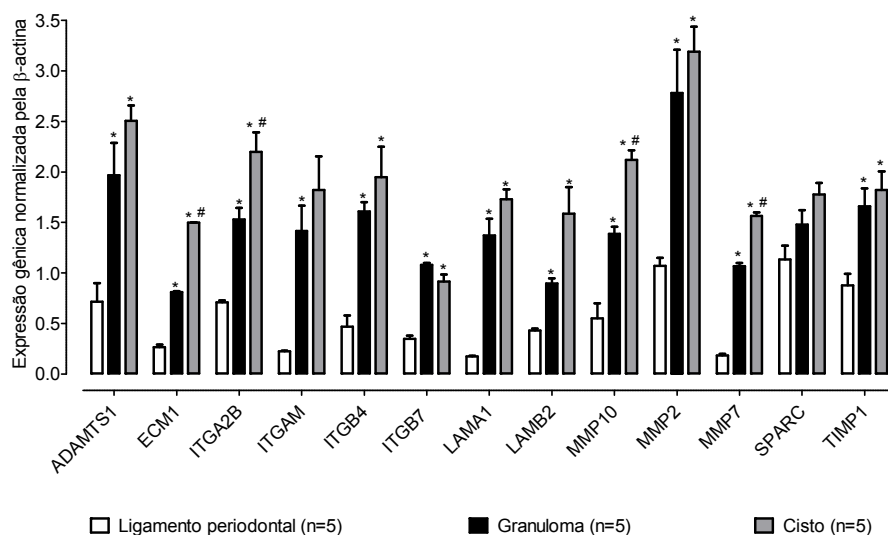
Dos 113 genes avaliados pelo *microarray* de DNA, 11 genes em granulomas periapicais e 17 genes em cistos foram mais expressos do que no ligamento periodontal sadio (Figura 2.7). Dentre os genes mais expressos nas lesões periapicais, ADAM metalopeptidase-1 (ADAMTS1), integrina- $\beta$ 4 (ITGB4), integrina- $\beta$ 7 (ITGB7), laminina- $\alpha$ 1 (LAMA1), MMP-2 e o inibidor tecidual de metaloproteinasas-1 (TIMP1) foram semelhantemente expressos em cistos e granulomas.

Os genes para a proteína da matriz extracelular-1 (ECM1), integrina- $\alpha$ 2B (ITGA2B), MMP-10, MMP-7, integrina- $\alpha$ M (ITGAM) e laminina- $\beta$ 2 (LAMB2) foram mais frequentemente observados em cistos, seguido por uma menor expressão em granulomas, e pouco expressos no ligamento periodontal sadio. A expressão do gene que codifica a osteonectina (SPARC) foi similar em todos os tecidos.

Os transcritos para integrina- $\alpha$ 3, integrina- $\alpha$ 5 e integrina- $\beta$ 1 em cistos e o fator de crescimento transformador- $\beta$  em granulomas estavam significativamente mais elevados nas lesões periapicais do que no ligamento periodontal sadio. MMP-24 foi detectada em granulomas e cistos, mas não no ligamento periodontal sadio e as metalopeptidase ADAM-13 e fosfoproteína secretada-1 foram encontradas exclusivamente em cistos, mas não no ligamento periodontal sadio ou nos granulomas periapicais. Catenina- $\alpha$ 1, TIMP-3 e seletina-L



foram expressas exclusivamente no ligamento periodontal sadio, porém não foram detectados nas lesões periapicais, indicando supressão destes genes pelas condições inflamatórias (Tabela 2.4).



**Figura 2.7.** Expressão de RNAm para componentes do meio extracelular em granulomas e cistos periapicais é diferente da expressão no ligamento periodontal sadio. O RNAm para cada transcrito foi normalizado pela expressão do gene

*housekeeping* β-actina. Gráfico de barras mostra média e desvio-padrão. \*  $p < 0,05$  comparado ao ligamento periodontal sadio, #  $p < 0,05$  comparado ao granuloma periapical.

**Tabela 2.4.** Expressão de RNAm para componentes do meio extracelular em cistos, granulomas e no ligamento periodontal sadio. Expressão de transcritos normalizada pelo gene β-actina

Transcritos	Ligamento periodontal	Granuloma	Cisto
ADAM metalopeptidase 13	-	-	1,22 ± 0,06
Colágeno tipo XVIII α1	0,67 ± 0,24	-	1,14 ± 0,01
Catenina-α1	0,39 ± 0,11	-	-
Integrina-α3	0,46 ± 0,08	-	1,67 ± 0,01*
Integrina-α5	0,79 ± 0,02	-	1,25 ± 0,01*
Integrina-β1	0,75 ± 0,1	-	2,06 ± 0,01*
Laminina-α5	0,74 ± 0,1	-	1,03 ± 0,01
Metaloproteínase da matriz-24	-	1,05 ± 0,32	1,34 ± 0,59
Fosfoproteína secretada-1	-	-	1,38 ± 0,01
Fator de crescimento transformador-β	0,46 ± 0,04	1,01 ± 0,1*	-
Inibidor tecidual de metaloproteinases-3	0,64 ± 0,21	-	-
L-seletina	0,32 ± 0,12	-	-

\*  $p < 0,05$  comparado ao ligamento periodontal sadio

***Granulomas periapicais apresentam maior atividade gelatinolítica do que os cistos periapicais e as metaloproteinases da matriz-9 e -13 são diferencialmente expressas nas duas condições***

Como alta expressão de RNAm para MMP-2 foi detectada em cistos e granulomas em comparação ao ligamento periodontal sadio, a atividade enzimática nos tecidos foi investigada por meio de zimografia *in situ*.

A atividade enzimática nas lâminas foi detectada por meio da liberação de um peptídeo fluorescente conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) após degradação do substrato e foi evidenciada em cistos e granulomas periapicais. Maior atividade gelatinolítica na região de células inflamatórias foi detectada em granulomas (Figuras 2.8A e 2.8B) comparado aos cistos (Figuras 2.8C e 2.8D). Baixa atividade enzimática foi detectada no ligamento periodontal sadio (Figura 2.8G).

A morfologia do núcleo celular, marcado por DAPI, indicou que a atividade gelatinolítica estava predominantemente localizada na região contendo um infiltrado inflamatório neutrofílico (Figura 2.8B). Esparsa atividade enzimática foi detectada próximo ao infiltrado de células mononucleadas e aos fibroblastos, e estava ausente na região do epitélio dos cistos. Lâminas incubadas com EDTA confirmaram que as proteases responsáveis pela atividade gelatinolítica eram metaloproteinases da matriz (Figura 2.8E) e a ausência de autofluorescência foi confirmada após incubar as lâminas com agarose sem gelatina (Figura 2.8F).

Para identificar as metaloproteinases da matriz responsáveis pela atividade gelatinolítica nos tecidos periapicais de humanos, detectada pela zimografia *in situ*, foi realizada imunistoquímica para MMP-2, MMP-9 e MMP-13, uma vez que essas metaloproteinases utilizam preferencialmente gelatina como substrato (Sternlicht e Werb, 2001; Leeman *et al.*, 2002).

Marcação positiva para MMP-2 foi observada no citoplasma celular em maior número de fibroblastos e células inflamatórias mononucleadas, em comparação aos neutrófilos polimorfonucleares ( $p < 0,01$ ), em ambos cistos e granulomas ( $p > 0,05$ ) (Figuras 2.8H, 2.8I, 2.9A, 2.9D). Por outro lado, MMP-9 e MMP-13 foram expressas por um maior número de células em granulomas comparado aos cistos ( $p < 0,01$ ) (Figuras 2.8J, 2.8K, 2.8L,

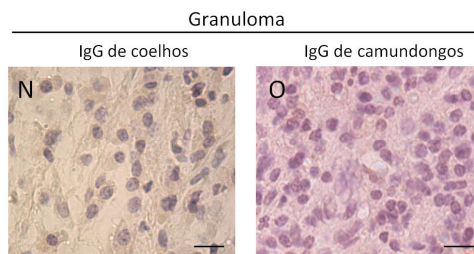
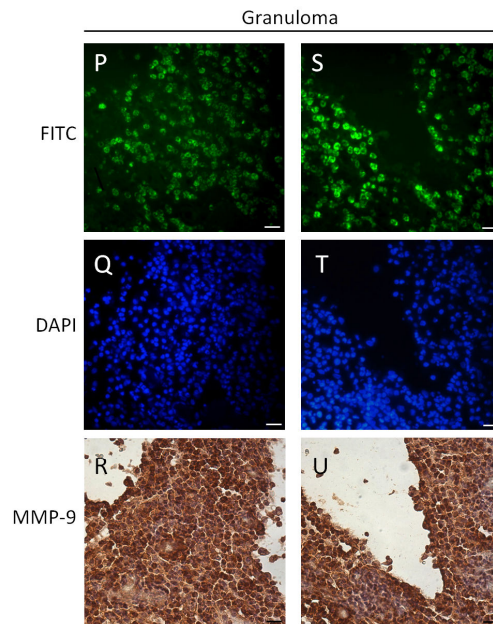
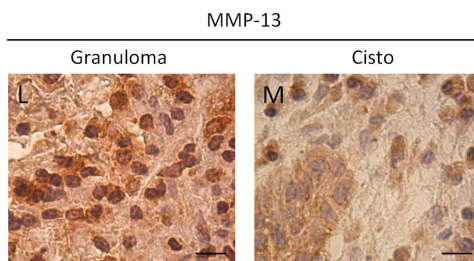
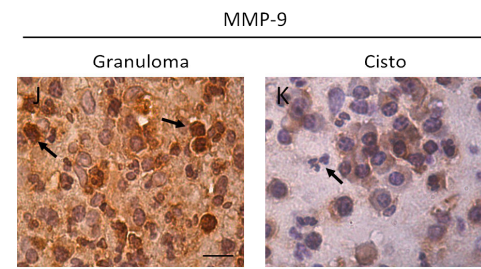
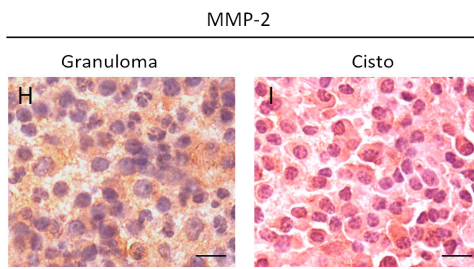
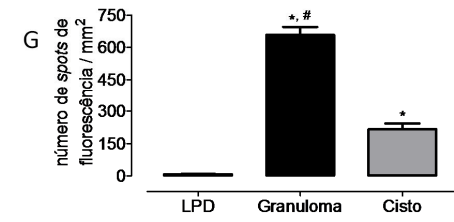
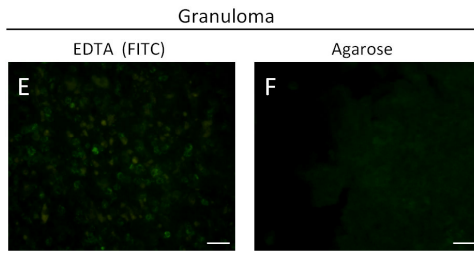
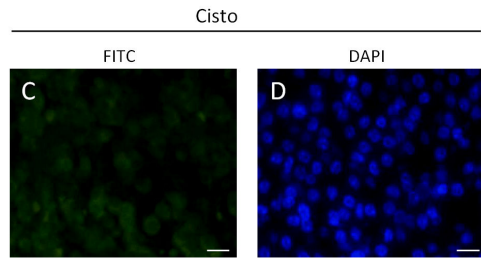
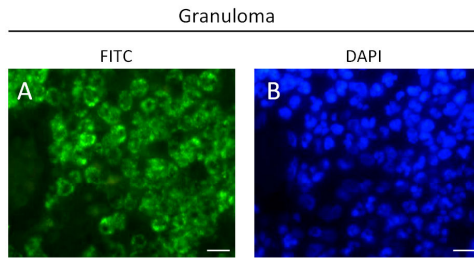
2.8M, 2.9B, 2.9C).

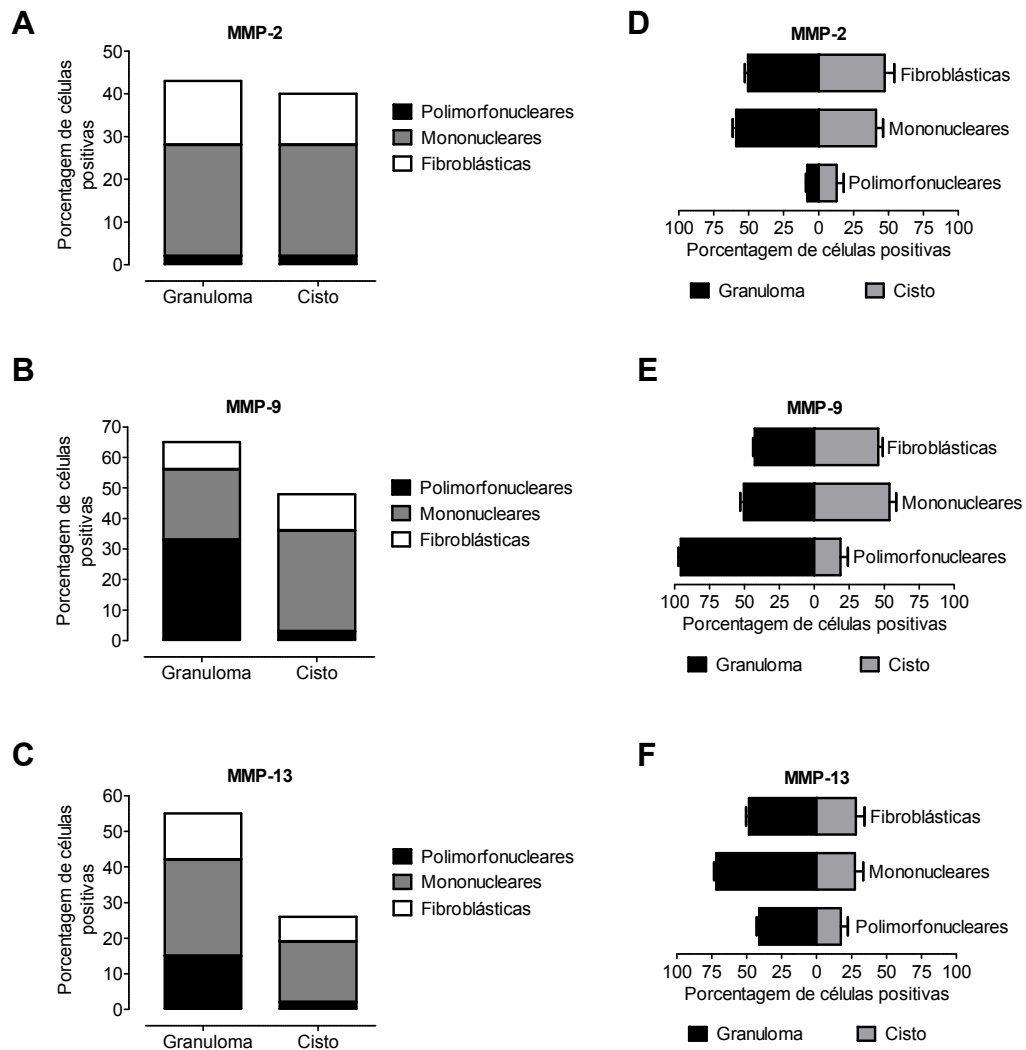
MMP-9 foi expressa mais intensamente por células inflamatórias em comparação às células fibroblásticas, em cistos e granulomas. Dentre as células inflamatórias, os polimorfonucleares neutrófilos estavam predominantemente corados em granulomas (Figura 2.8J), enquanto as células inflamatórias mononucleadas estavam coradas em maior porcentagem nos cistos periapicais (Figura 2.8K). Dentre os polimorfonucleares presentes no granuloma periapical, 95,6% deles eram positivos para a MMP-9, diferentemente dos cistos, que apresentaram poucos polimorfonucleares MMP-9 positivos (Figura 2.9E). A expressão de MMP-9 nos granulomas (Figuras 2.8R e 2.8U) foi observada em áreas com intensa atividade gelatinolítica (Figuras 2.8P, 2.8Q, 2.8S, 2.8T).

MMP-13 foi observada com maior frequência em células inflamatórias mononucleadas em cistos e granulomas, e em menor extensão em fibroblastos (Figuras 2.8L, 2.8M). Pequena porcentagem de polimorfonucleares neutrófilos estavam corados em cistos e granulomas, com marcação significativamente menor em cistos ( $p < 0,01$ ) (Figuras 2.9C e 2.9F).

Nos cistos periapicais, as células epiteliais estavam positivamente coradas para MMP-2, MMP-9 e MMP-13, porém não foi evidenciada atividade enzimática, indicando que estas metaloproteinases da matriz estavam inativas. Controles utilizando IgG de camundongos ou coelhos indicaram ausência de marcação não-específica (Figuras 2.8N e 2.8O).

**Figura 2.8.** Expressão e atividade das metaloproteinases da matriz são distintas em cistos e granulomas periapicais. Áreas de atividade gelatinolítica foram detectadas pela zimografia *in situ* e aparecem como pontos de fluorescência verdes (**A, C, E, F**); os componentes celulares na área foram visualizados por meio de marcação nuclear por DAPI (**B, D**). Lâminas-controle incubadas com EDTA foram usadas para confirmar a atividade gelatinolítica devido à presença de metaloproteinases da matriz (**E**). O grau de autofluorescência nos tecidos foi avaliado incubando as lâminas com agarose sem gelatina (**F**). Os gráficos representam o número de pontos de fluorescência por mm<sup>2</sup> em cistos, granulomas e no ligamento periodontal sadio (LPD); \*  $p < 0,05$  comparado ao ligamento periodontal sadio, #  $p < 0,05$  comparado aos cistos periapicais (n = 25) (**G**). Imunoistoquímica para MMP-2, MMP-9 e MMP-13 foi realizada para confirmar o perfil de metaloproteinases da matriz em cistos e granulomas periapicais. MMP-2 foi corada similarmente em granulomas (**H**) e cistos (**I**) enquanto MMP-9 foi expressa por maior quantidade de polimorfonucleares neutrófilos (setas) em granulomas (**J**), mas não em cistos periapicais (**K**). Uma grande quantidade de células foram positivas para MMP-13 em granulomas (**L**), diferentemente dos cistos, que apresentaram menor coloração em células inflamatórias mononucleadas (**M**). Lâminas-controle foram utilizadas, nas quais o anticorpo primário foi omitido e as lâminas foram incubadas com IgG de coelhos (**N**) ou camundongos (**O**) e revelaram pouca coloração não-específica; Barra = 10 µm. Áreas indicando atividade enzimática de metaloproteinases da matriz (**P, S**) em polimorfonucleares neutrófilos (**Q, T**) em granulomas periapicais estavam co-localizadas à expressão de MMP-9 detectada por imunoistoquímica (**R, U**). Barra = 30 µm.





**Figura 2.9.** Metaloproteínases da matriz são diferencialmente expressas pelos componentes celulares nas lesões periapicais. A quantificação da porcentagem de células positivamente coradas foi realizada agrupando as células em polimorfonucleares neutrófilos, células inflamatórias mononucleadas e células fibroblásticas. A porcentagem de células expressando MMP-2, MMP-9 e MMP-13 foi calculada em relação à quantidade total de células, por campo de visão, em três áreas representativas (**A**, **B**, **C**). Para estimar a quantidade de células positivas no mesmo grupo de células, a porcentagem de polimorfonucleares neutrófilos, células inflamatórias mononucleadas e fibroblastos que expressavam MMP-2 (**D**), MMP-9 (**E**) e MMP-13 (**F**) foi calculada.

## DISCUSSÃO

Durante o desenvolvimento da lesão periapical os diversos componentes da matriz extracelular são progressivamente degradados, principalmente devido à contaminação microbiana do sistema de canais radiculares (Eberhard e Plagmann, 1999). Dentre estes

componentes estão o colágeno, a fibronectina, a laminina e as proteoglicanas de baixo peso molecular (Delzangles *et al.*, 1997). A marcante desorganização das fibras colágenas na lesão periapical pode ser potencialmente causada por metaloproteinases da matriz, enzimas importantes tanto para a remodelação como para a destruição tecidual. Neste estudo foi demonstrado que a presença de microrganismos no sistema de canais radiculares estava associada à presença de severa desorganização tecidual e à maior expressão de metaloproteinases da matriz na região periapical.

A ausência de desorganização tecidual ou a presença de desorganização leve podem ser considerados sucesso do tratamento endodôntico, levando-se em consideração a duração do período de acompanhamento. Esses desfechos foram encontrados nos dentes com vitalidade pulpar submetidos ao tratamento endodôntico ou nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora. Nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora foi evidenciada menor porcentagem de raízes contaminadas pós-tratamento endodôntico, possivelmente devido à atividade antimicrobiana atribuída ao hidróxido de cálcio (Leonardo *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 2002; Leonardo *et al.*, 2006). Os íons hidroxila atuam direta e irreversivelmente em moléculas essenciais para o metabolismo e reprodução microbianos, dentre elas as enzimas, ácidos nucléicos, fosfolipídeos de membrana e ácidos graxos insaturados. Ainda, a presença física do curativo de demora no canal radicular impede o influxo de nutrientes e a recolonização bacteriana (Siqueira-Junior e Lopes, 1999).

Por outro lado, nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única, havia persistência de bactérias pós-obturação dos canais radiculares e desorganiza o do tecido conjuntivo, indicando um reduzido reparo periapical. A alta atividade inflamatória observada na região periapical nos dentes submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única associado   persistência de bactérias no sistema de canais radiculares levaram ao atraso na dinâmica do reparo apical e periapical concomitantemente   alta expressão de metaloproteinases da matriz. A persistência de microrganismos no sistema de canais radiculares é considerada um dos responsáveis pela manuten o de um infiltrado inflamatório crônico periapical pós-tratamento de canais radiculares (Leonardo *et al.*, 1994; Siqueira-Junior, 2001; Fabricius *et al.*, 2006).

As metaloproteinases da matriz participam dos estágios iniciais da destrui o do

tecido pulpar em eventos inflamatórios não-controlados, como no caso de uma pulpíte irreversível (Shin *et al.*, 2002; Wahlgren *et al.*, 2002; Gusman *et al.*, 2002; Tsai *et al.*, 2005). Com a progressão da necrose tecidual para a região apical, concomitantemente à contaminação dos canais radiculares, existe um recrutamento de células inflamatórias para os tecidos periapicais e reabsorção do tecido ósseo na região. As metaloproteinases da matriz foram imunomarcadas em tecidos periapicais de humanos previamente e foi proposto que as MMP-1, -8, -9 e -13 estão envolvidas na expansão das lesões periapicais (Teronen *et al.*, 1995a, 1995b; Leonardi *et al.*, 2005; Carneiro *et al.*, 2009). Neste estudo, nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora, foi observado um menor índice de atividade inflamatória acompanhando por um aumento do número de fibroblastos na região periapical. Nas células presentes na região periapical havia menor expressão de MMP-2, -8 e -9 do que nos dentes com lesão periapical sem tratamento ou naqueles submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única. Estes resultados demonstram que a utilização de um curativo de demora à base de hidróxido de cálcio auxilia no processo de reparo periapical que está relacionado a uma menor expressão de metaloproteinases da matriz na área.

Embora ainda não existam estudos *in vivo* demonstrando o papel do hidróxido de cálcio na regulação de metaloproteinases da matriz, *in vitro*, células da linhagem osteoblástica MG63 estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) extraído de *Prevotella nigrescens* expressaram grande quantidade de RNAm para MMP-1. Quando o LPS foi misturado ao hidróxido de cálcio, houve menor expressão de RNAm para MMP-1 com maior expressão do inibidor tecidual de metaloproteinases da matriz-1 (TIMP-1) (Yang *et al.*, 2006). Entretanto esses efeitos não podem ser diretamente atribuídos ao hidróxido de cálcio, uma vez que é amplamente conhecido que o hidróxido de cálcio é capaz de hidrolisar o LPS bacteriano *in vitro* (Safavi e Nichols, 1993) e, portanto, inibir seus efeitos tóxicos *in vivo* (Nelson-Filho *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2002, 2008). Dessa maneira, a menor expressão de RNAm para MMP-1 poderia ser um efeito indireto do pré-tratamento do LPS com hidróxido de cálcio e, portanto, de sua inativação.

Com objetivo de investigar se as metaloproteinases da matriz estão envolvidas na lesão periapical de humanos e estender a avaliação da importância dessas proteases na patogênese da lesão periapical, cistos e granulomas periapicais de humanos foram utilizados



para avaliar a expressão e atividade de metaloproteinases da matriz por meio de *microarrays* de DNA, zimografia *in situ* e imunoistoquímica.

O diagnóstico diferencial de cistos e granulomas periapicais por meio de radiografias periapicais convencionais é problemático (Ricucci *et al.*, 2006). Embora alguns estudos tenham proposto que a tomografia computadorizada e o ultrassom com *Doppler* possam ser utilizados com a finalidade de diferenciar cistos e granulomas (Cotti *et al.*, 2003; Simon *et al.*, 2006; Aggarwal *et al.*, 2008), a avaliação histológica ainda é considerada o padrão-ouro para confirmar o diagnóstico (Kabak *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 1997, 2007, 2009; Schulz *et al.*, 2009). Porém a avaliação microscópica é realizada somente após a remoção da lesão periapical, o que é uma limitação, uma vez que, na maioria dos casos, o tratamento endodôntico é conservador e as cirurgias periapicais são realizadas somente em casos refratários ao tratamento convencional. A incapacidade para identificar o *status* da lesão periapical torna o prognóstico imprevisível, uma vez que cistos geralmente não reparam após tratamento endodôntico convencional e requerem procedimentos cirúrgicos adicionais (Nair *et al.*, 1993, 1996; Nair, 1998; García *et al.*, 2007). Dessa maneira, a identificação de componentes moleculares da matriz extracelular pode ser a base para a determinação de biomarcadores do *status* da lesão periapical e futuramente possibilitar o diagnóstico de cistos e granulomas previamente à realização do tratamento endodôntico. Possíveis candidatos a biomarcadores incluem as metaloproteinases da matriz, proteases responsáveis pela degradação do meio extracelular.

Por meio de zimografia *in situ*, foi demonstrada a presença e alta densidade de metaloproteinases da matriz ativas, principalmente na área com maior concentração de células inflamatórias nos granulomas periapicais. Embora a expressão de metaloproteinases da matriz tenha sido demonstrada em lesões periapicais de humanos previamente (Teronen *et al.*, 1995a, 1995b; Lin *et al.*, 1997; Shin *et al.*, 2002; Wahlgren *et al.*, 2002; Leonardi *et al.*, 2005; Carneiro *et al.*, 2009), este é o primeiro estudo a identificar e localizar áreas de atividade enzimática nos tecidos.

Padrões distintos de imunomarcção foram observados em cistos e granulomas. A camada de células epiteliais nos cistos estava positivamente corada para MMP-2, -9 e -13, embora tenha exibido baixa atividade enzimática que pode ser devido à reduzida matriz extracelular nos tecidos epiteliais (Fu *et al.*, 2001). Por outro lado, no tecido conjuntivo de ambas as lesões, onde as células inflamatórias estão localizadas, foi detectada atividade

enzimática de metaloproteinases da matriz. No estroma da lesão, a expressão de MMP-2 era difusa pela matriz extracelular e as células exibiram fraca marcação citoplasmática. MMP-9 e -13 estavam localizadas e mais evidentes na zona de células inflamatórias, com forte marcação intracelular. De modo singular, os granulomas periapicais apresentaram alta expressão de MMP-13 e um padrão de expressão de MMP-9 nas células polimorfonucleares, diferentemente dos cistos.

A simultânea e mais evidente expressão de MMP-9 e -13 em granulomas sugere um mecanismo de regulação coordenado destas proteases na dinâmica da lesão periapical. A interação entre MMP-9 e -13 se deve ao fato de que a MMP-13 é capaz de ativar a MMP-9 (Leeman *et al.*, 2002), o que poderia explicar a atividade enzimática mais intensa observada em granulomas periapicais.

O papel dos neutrófilos polimorfonucleares na progressão da lesão periapical é conhecido (Yamasaki *et al.*, 1994). A expressão distinta de MMP-9 em polimorfonucleares nos granulomas, comparado aos cistos, representa um achado interessante, uma vez que as células polimorfonucleares apresentam um mecanismo distinto de regulação de metaloproteinases da matriz. A síntese de MMP-9 está completa quanto os polimorfonucleares fazem a diapedese e a regulação dessa enzima é mediada pela liberação de granulos citoplasmáticos e não por eventos transcripcionais (Chakraborti *et al.*, 2003). Dessa maneira não é surpreendente que os dados obtidos na análise de *microarray* não revelaram diferente expressão de RNAm para MMP-9. Além disso, em geral, a atividade das metaloproteinases da matriz é regulada por mecanismos pós-transcrição via clivagem do pró-peptídeo ou por inibidores teciduais de metaloproteinases da matriz e, dessa maneira, a atividade de qualquer metaloproteinase da matriz não necessariamente é o reflexo da expressão gênica. Entretanto, o mecanismo envolvido no recrutamento de uma maior porcentagem de polimorfonucleares positivamente marcados para MMP-9 e a alta atividade enzimática observada nos granulomas em comparação aos cistos ainda precisa ser investigado.

Durante a formação da lesão periapical experimental em ratos existe alta expressão de MMP-2 e -9 até por volta de 21 dias pós-contaminação dos canais radiculares, período este caracterizado por uma alta densidade de polimorfonucleares neutrófilos nos tecidos. Com o passar do tempo e cronicidade do processo, por volta de 30 dias, há maior prevalência de células mononucleadas e proliferação de células epiteliais na lesão periapical,

com menor expressão de metaloproteinases da matriz (Corotti *et al.*, 2009), sugerindo um possível mecanismo para as metaloproteinases da matriz na transformação de granuloma para cisto periapical. Em estágios avançados da progressão da lesão periapical, padrão similar de redução tempo-dependente da expressão de MMP-12 foi observado (Morimoto *et al.*, 2008).

Estudos prévios demonstraram que a expressão de MMP-1 em cistos periapicais de humanos está restrita ao tecido epitelial circundando a lesão, macrófagos subepiteliais, fibroblastos e células endoteliais (Lin *et al.*, 1997), enquanto durante o desenvolvimento da lesão periapical de ratos, observou-se a expressão de MMP-1 em regiões do tecido ósseo que estão em processo de reabsorção ativa (Lin *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2004). Por outro lado, neste estudo foi observado que a expressão de MMP-9 e -13 foi mais intensa na zona de células inflamatórias na lesão, indicando que diferentes metaloproteinases da matriz são produzidas e secretadas em sítios distintos, por células que compõe a lesão periapical. Estes resultados sugerem que cada metaloproteinase da matriz desempenha um papel específico na patogênese da lesão periapical. Publicações recentes especularam acerca de funções divergentes para as metaloproteinases da matriz durante o desenvolvimento e progressão das lesões periapicais, estimulando a expansão da lesão intra-óssea (Metzger *et al.*, 2008) ou inibindo sua progressão (Tjäderhane *et al.*, 2007). Estes dados e os resultados do presente trabalho mostram que é importante caracterizar o perfil de metaloproteinases da matriz no desenvolvimento da lesão periapical previamente à utilização terapêutica de pan-inibidores, que inibem inespecificamente metaloproteinases com funções distintas (Verma e Hansch, 2007).

Por meio de *microarrays* de cDNA específico para detectar RNAm para moléculas componentes da matriz extracelular, foi demonstrado que algumas metaloproteinases da matriz são mais expressas em cistos e granulomas periapicais de humanos do que no ligamento periodontal sadio. Além disso, maior atividade gelatinolítica foi detectada em granulomas periapicais, especificamente na área com maior concentração de células inflamatórias e, por meio de imunomarcação, foi confirmada a presença de MMP-9 e -13 no processo. Recentemente foi demonstrado que pacientes com lesão periapical visível radiograficamente apresentaram expressão de MMP-2 e MMP-9 mais alta do que indivíduos-controle sadios (Belmar *et al.*, 2008), por meio de análise do fluido crevicular, porém a identidade da lesão não foi caracterizada microscopicamente. Uma vez que no

presente estudo foi demonstrada expressão diferencial de MMP-9 e -13 em cistos e granulomas periapicais, estas moléculas poderiam ser investigadas como potenciais marcadores moleculares do *status* da lesão periapical e exploradas mais profundamente *in vivo* por meio de análise do fluido crevicular com o objetivo de tentar diferenciar clinicamente cistos e granulomas periapicais.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo podemos concluir que:

- ✓ A contaminação dos canais radiculares levou à formação de lesão periapical, na qual são expressas as metaloproteinases da matriz-1, -2, -8 e -9.
- ✓ A expressão de metaloproteinases da matriz foi modulada pelo tratamento endodôntico quando se utilizou o hidróxido de cálcio como curativo de demora entre sessões enquanto o tratamento endodôntico em sessão única permitiu a persistência da lesão periapical e alta expressão de metaloproteinases da matriz, similarmente aos dentes com lesão periapical não submetidos ao tratamento endodôntico.
- ✓ A persistência de bactérias no sistema de canais radiculares e nas lacunas de reabsorção do cemento estava associada à maior desorganização das fibras colágenas e maior expressão de metaloproteinases da matriz.
- ✓ As metaloproteinases da matriz são expressas em cistos e granulomas periapicais de humanos, com um padrão distinto de atividade enzimática em granulomas que poderia ser considerado um marcador do *status* da lesão periapical.

### **CAPÍTULO 3. O HIDRÓXIDO DE CÁLCIO INDUZ A DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL EM CEMENTOBLASTOS E PROMOVE MINERALIZAÇÃO VIA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DO CIMENTO-1 (CEMP-1) E DE PROTEÍNAS QUINASES REGULADAS POR SINAL EXTRACELULAR (ERK-1 / ERK-2)**

O periodonto de sustentação compreende os tecidos que sustentam o elemento dental e é composto pelo cemento radicular, pelo ligamento periodontal e pelo osso alveolar propriamente dito (Nanci e Bosshardt, 2006). Acredita-se que as células que produzem os tecidos mineralizados do periodonto sejam originárias do ligamento periodontal em um sistema de pronta-entrega, uma vez que as células mesenquimais progenitoras no ligamento periodontal são capazes de se diferenciar em células com um fenótipo cementoblástico ou osteoblástico (Liu *et al.*, 1997; Gzesik *et al.*, 2002; Bosshardt, 2005; Xu *et al.*, 2009). A presença de células mesenquimais progenitoras no ligamento periodontal foi demonstrada previamente, por meio da detecção dos receptores de superfície STRO-1, CD-146 e CD-44 (Seo *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006; Nagatomo *et al.*, 2006; Gay *et al.*, 2007; Jo *et al.*, 2007; Fujii *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2009). Dentre os marcadores presentes em células mesenquimais, as células STRO-1 positivas, encontradas no folículo do germe dentário de camundongos, estão envolvidos na formação do periodonto de sustentação (Kémoun *et al.*, 2007a, 2007b).

A polpa dental é um tecido conjuntivo frouxo localizado no interior dos canais radiculares do elemento dental. Esse tecido apresenta capacidade de defesa frente aos estímulos pró-inflamatórios advindos das lesões de cárie, caracterizada pela deposição de um tecido mineralizado com o objetivo de isolar o agente agressor (Smith *et al.*, 1995; Smith, 2003; Lee *et al.*, 2006; Sloan and Smith, 2007; Paula-Silva *et al.*, 2009). Quando essa defesa é vencida, a polpa dental se torna contaminada por microrganismos, o tecido pulpar é destruído e ocorre o aparecimento da lesão periapical. A lesão periapical não-controlada leva à destruição dos tecidos de suporte periapicais, iniciando pela dissociação das fibras do ligamento periodontal, com posterior reabsorção dos tecidos cementário e ósseo e culminando com a perda do elemento dental (Martón e Kiss, 2000). O tratamento endodôntico em dentes com lesão periapical, por meio de técnicas adequadas, permite o restabelecimento da condição de normalidade nos tecidos apicais e periapicais, pela deposição de tecido ósseo e cementóide. Estes resultados podem ser obtidos utilizando terapias endodônticas que promovem a reparação / regeneração tecidual, pela estimulação

da diferenciação de células mesenquimais progenitoras do ligamento periodontal em cementoblastos ou osteoblastos. Embora a diferenciação osteoblástica seja bastante estudada, os mecanismos envolvidos na diferenciação de cementoblastos são ainda pouco conhecidos (Saygin *et al.*, 2000; Grzesik e Narayanan, 2002; Bosshardt, 2005).

A escassez de estudos sobre a diferenciação de cementoblastos está relacionada, em parte, à dificuldade em identificar cementoblastos diferenciados, pois as moléculas expressas por estas células são pleiotrópicas e poucos marcadores específicos da linhagem cementoblástica são conhecidos (Saygin *et al.*, 2000; Grzesik e Narayanan, 2002; Foster e Sommerman, 2005; Gonçalves *et al.*, 2005; Álvarez-Pérez *et al.*, 2006). A proteína do cimento-1 (CEMP-1) é uma molécula expressa por células do ligamento periodontal e em altas concentrações em cementoblastos *in vitro* e *in vivo*, podendo, portanto, ser considerada um potencial regulador do metabolismo do cimento (Arzate *et al.*, 2002; Álvarez-Pérez *et al.*, 2006; Kitagawa *et al.*, 2006; Kémoun *et al.*, 2007a). A proteína de ligação ao cimento (*cementum attachment protein*, CAP) também tem sido utilizada como um marcador da diferenciação cementoblástica (Arzate *et al.*, 1992, Saito *et al.*, 2001), embora existam indícios de que a proteína de ligação ao cimento seja um precursor da proteína do cimento-1, uma vez que ambas são reconhecidas pelo mesmo anticorpo. Portanto, acredita-se que a diferença entre os pesos moleculares nestas duas espécies sejam devido a modificações pós-transdução (Arzate *et al.*, 2002; Álvarez-Pérez *et al.*, 2006).

O hidróxido de cálcio tem sido bastante utilizado na Endodontia, especificamente nas proteções pulpares e pulpotomia, como curativo de demora entre sessões e na composição de cimentos obturadores (Stanley e Pameijer, 1997; JOE Editorial Board, 2008; Leonardo, 2008). Os efeitos biológicos do hidróxido de cálcio são atribuídos à sua dissociação em íons hidroxila (OH<sup>-</sup>) e íons cálcio (Ca<sup>++</sup>). No meio extracelular, o hidróxido de cálcio apresenta propriedades mineralizadoras, uma vez que os íons hidroxila estão envolvidos na manutenção de um ambiente alcalino e os íons cálcio têm um efeito direto na mineralização da matriz extracelular (Fava e Saunders, 1999).

No interior da célula, os íons cálcio atuam como mediadores intermediários da diferenciação de osteoblastos. Aumentos intracelulares na concentração de cálcio levam a ativação da via de sinalização cálcio-calmodulina, a qual regula a diferenciação de osteoblastos via fosforilação de quinases reguladas por sinalização extracelular (ERK -1 / ERK-2) e expressão de *c-fos* (Zayzafoon *et al.*, 2005; Zayzafoon, 2006). Porém, o efeito do

aumento da concentração extracelular de íons cálcio na diferenciação de cementoblastos ainda não foi demonstrada.

Estudos prévios demonstraram que a aplicação do hidróxido de cálcio no interior dos canais radiculares permite a deposição de um tecido mineralizado semelhante ao cimento, por células do ligamento periodontal, obliterando a abertura foraminal (Leonardo *et al.*, 1993a, 1993b, 2006). Neste estudo foi evidenciado que a utilização do hidróxido de cálcio como curativo de demora em dentes com lesão periapical permitiu o selamento biológico do forame apical, diferentemente dos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única, nos quais não foi observada a deposição de tecido cementóide. Ainda, a deposição de tecido mineralizado nos espécimes deste grupo estava mais avançada do que naqueles dentes com vitalidade pulpar submetidos ao tratamento endodôntico, sugerindo um papel para o hidróxido de cálcio na cementogênese apical. Em decorrência desta observação, o presente estudo foi proposto com o objetivo de avaliar os efeitos do aumento da concentração extracelular de cálcio na diferenciação de células do ligamento periodontal em cementoblastos e posterior cementogênese. Mais especificamente, a neoformação de cimento foi avaliada *in vivo* em um modelo animal e a partir dos resultados obtidos foram investigados os mecanismos celulares e intracelulares envolvidos na proliferação, migração, diferenciação e mineralização mediada por células do ligamento periodontal de humanos.

## **MATERIAL E MÉTODO**

### **Animais, procedimentos operatórios e processamento histológico**

Foram utilizados para este protocolo experimental as peças obtidas no grupo experimental no qual os dentes com lesão periapical foram submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora (Grupo 3) e as peças obtidas de dentes com vitalidade pulpar não submetidos ao tratamento endodôntico (Grupo 5). Os tecidos embebidos em parafina foram seccionados e corados pela Hematoxilina e Eosina para análise histológica e para microdissecção a laser ou por imunoistoquímica. Os procedimentos clínicos e o processamento histológico realizados foram descritos no Capítulo 1.

### Microdissecção a laser e extração de RNA total

Nas lâminas coradas pela Hematoxilina e Eosina, as células do ligamento periodontal apical foram coletadas por meio de microdissecção e captura a laser (Leica AS / LMD®, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). A técnica de microdissecção a laser, desenvolvida em 1996 por pesquisadores do *National Cancer Institute* nos EUA, tornou-se uma ferramenta extremamente importante na pesquisa biológica, ampliando o uso de técnicas existentes de Biologia Molecular. Com esta técnica é possível obter material celular homogêneo a partir de tecidos heterogêneos, em parafina ou congelados (Bonner *et al.*, 1997; Takagi *et al.*, 2004; Shao *et al.*, 2006). Os tecidos são coletados em lâminas especiais, as quais apresentam em sua superfície um filme termoplástico transparente não-aderido e são inseridas no microscópio com a superfície voltada para baixo. A imagem da lâmina é transferida para um computador e a área de interesse delimitada sob visualização microscópica direta. A seguir, pulsos de laser infravermelho são ativados e o filme transparente juntamente com o tecido são cortados e se desprendem da lâmina caindo sobre a parte interna da tampa de um tubo tipo *ependorf* (Emmert-Buck *et al.*, 1996; Bonner *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 2004).

Neste estudo, as amostras foram coletadas em 4 regiões distintas do ligamento periodontal: (1) células da camada cementoblástica, próximas ao elemento dental, (2) células da região central do ligamento periodontal, (3) células da camada osteoblástica, próximas ao tecido ósseo e (4) células em contato com o tecido cementário neoformado nos espécimes do Grupo 3. Foram identificadas e coletadas  $9 \times 10^3$  células por espécime ( $n = 5$ ), em cada grupo. O RNA total foi extraído utilizando o RNeasy Micro kit (RNeasy® Micro, Qiagen Inc., Valencia, EUA) e a qualidade e quantidade de RNA total foram analisados utilizando um sistema de eletroforese capilar em um RNA 6000 Pico LabChip (Agilent 2100 BioAnalyzer, Agilent Technologies Inc, Santa Clara, CA). Com o objetivo de amplificar a quantidade de RNAm obtida em cada espécime foi utilizado um sistema de amplificação de RNA *in vitro* por meio de um *kit* TrueLabeling-PicoAMP™ (SABiosciences, Frederick, MD). Suscintamente, o processo de transcrição e amplificação *in vitro* foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa, foi realizado anelamento do *primer* oligo dT ao RNAm poliadenilado e a transcrição reversa do RNA total para obtenção do DNA complementar (cDNA) (RT Master Mix 1). A seguir, foi realizada a síntese da fita paralela ao cDNA (Second Strand Master Mix 1), obtendo desta maneira uma dupla-fita de DNA. À solução contendo a dupla-fita de DNA foi adicionada a enzima RNA-polimerase e nucleotídeos em uma solução



tampão (RNA Amplification Master Mix 1) e as amostras foram incubadas a 37°C, por 8 horas, para transcrição *in vitro*. A dupla-fita de DNA foi quebrada utilizando uma enzima DNase e o RNA resultante foi purificado em uma coluna para remover sais e fragmentos de DNA carregados de reações anteriores. Na segunda etapa, o procedimento foi repetido, porém as amostras foram incubadas a 37°C, por 16 horas, para amplificar a síntese de RNA. As amostras de RNA foram suspensas em água deionizada e livre de RNase e armazenadas a -70°C.

### **Transcrição reversa e reação da polimerase em cadeia em tempo real (qRT-PCR)**

O cDNA foi sintetizado por meio de uma reação de transcrição reversa, a partir de 1 µg de RNA total. As amostras foram incubadas a 25°C por 10 minutos para ligação do *primer* ao RNA, seguido por incubação a 37°C por 2 horas para transcrição reversa utilizando a enzima transcriptase reversa e posterior incubação a 85°C por 5 segundos para inativação da enzima e finalização do processo (High Quality cDNA Reverse Transcriptase Kits, Applied Biosystems, Foster City, EUA).

Alíquotas de 5 µl de cDNA foram amplificados por qRT-PCR utilizando *primers* para genes indicadores de um fenótipo cementoblástico ou osteoblástico: Proteína do Cimento-1 (*Cemp-1*), *Runt-related transcription factor 2 (Runx2)*, sialoproteína óssea (*Bsp*), e osteocalcina (*Oc*). O gene *housekeeping* para a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*) foi utilizado como um controle interno. Os *primers* e sondas para *Runx2*, *Bsp*, *Oc* e *Gapdh* foram obtidos comercialmente e são propriedades privadas, portanto as sequências não estão disponíveis (TaqMan® Gene Expression Assay, Applied Biosystems). *Primers* para *Cemp-1* e *Gapdh* foram criados a partir da sequência de RNAm para o gene-alvo por meio do programa Primer Express (Applied Biosystems). A sequência para o *primer* para *Cemp-1* utilizado foi 5' CAG GAT CCA CAT CCG TC 3' (*forward*) e 5' CTG AAC AGC TTC GAG GC 3' (*reverse*) e para *Gapdh* foi 5'- ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (*forward*) e 5'- TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (*reverse*).

Em estudo piloto, as reações da polimerase em cadeia em tempo real foram otimizadas com relação às concentrações ideais de cada par de *primers* e temperatura de anelamento, com o objetivo de maximizar a eficiência e a especificidade de cada amplificação. Para o sistema TaqMan®, foram utilizados *primers* na concentração final de 900 nM cada e sonda MGB (*Minor Groove Binding*) na concentração final de 250 nM. Neste

sistema, o fluoróforo 6-FAM é utilizado como repórter, o qual é liberado após clivagem pela polimerase com atividade exonuclease 5'. A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: ativação da polimerase AmpliTaq Gold Enzyme a 95 °C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos para desnaturação do DNA e 60 °C por 1 minuto para anelamento do *primer* e polimerização.

Os *primers* para a *Cemp-1* e *Gapdh* foram utilizados juntamente com o fluoróforo SYBR<sup>®</sup> Green (SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix; Applied Biosystems), na concentração de 60 nM cada, e a amplificação foi realizada a 95°C por 10 minutos para ativação da polimerase AmpliTaq Gold Enzyme, seguida por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos para desnaturação do DNA, 55°C por 20 segundos para anelamento do *primer* e polimerização e 72°C por 50 segundos para extensão adicional devido ao tamanho do *primer* (433 bp para *Cemp-1* e 562 bp para *Gapdh*). Para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação, foi empregado um ciclo final de 1,5 horas, com temperatura crescente de 60 a 95°C.

O termociclador ABI7500 (Applied Biosystems) realiza as reações de amplificação e detecção, e o *Software* ABI Prism SDS 1.2 (Applied Biosystems) quantifica as amostras por meio da análise da quantidade de fluorescência gerada pela incorporação do fluoróforo SYBR<sup>®</sup> Green aos produtos de amplificação durante o curso da reação ou pela liberação do fluoróforo 6-FAM após a clivagem pela exonuclease 5'.

Os resultados foram analisados com base no valor do ciclo limiar (*Ct*, *cycle threshold*), sendo este o ponto correspondente ao número do ciclo no qual a amplificação das amostras atinge um limiar. Este limiar é determinado entre o grau de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras que permite a análise quantitativa da expressão do gene avaliado. Como controle negativo foi utilizada água destilada deionizada, submetida a reação com cada par das seqüências dos *primers* utilizados. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada utilizando o método  $\Delta\Delta C_t$ , com base na expressão do gene *Gapdh*. Os grupos foram comparados entre si por meio do teste t de Student e a expressão gênica em diferentes áreas no mesmo grupo foram submetidos à análise estatística por meio da análise de variância de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

### **Imunofluorescência indireta dual nos tecidos obtidos de cães**

Com o objetivo de identificar a origem das células presentes na região do neocemento apical foram realizados ensaios de imunofluorescência indireta para STRO-1, um marcador de células mesenquimais (Seo *et al.*, 2004), e para CEMP-1, uma proteína específica do cimento (Álvarez-Pérez *et al.*, 2006).

As lâminas foram desparafinizadas, hidratadas em série decrescente de álcoois e mantidas em salina fosfatada tamponada (PBS). As lâminas foram lavadas em PBS por 5 minutos (2x) e os tecidos submetidos à recuperação dos epítomos antigênicos utilizando solução tampão de citrato de sódio (pH 6,0), aquecido a 90°C, por 15 minutos. A seguir foram lavadas em PBS por 5 minutos (2x) e os sítios de ligação não-específica foram bloqueados com albumina de soro bovino (Sigma) a 2% por 60 minutos. A imunomarcagem dual foi realizada utilizando anticorpos primários para CEMP-1 (anticorpo policlonal produzido em coelhos; 1:300) e STRO-1 (anticorpo monoclonal anti-STRO-1, R&D Systems Inc., Minneapolis, EUA; 1:10) por 1 hora. A seguir as lâminas foram lavadas em PBS (2x) e incubadas com anticorpo secundário (1:100; anti-IgG de coelhos conjugado ao fluoróforo Texas Red, produzido em cabra ou anti-IgM de camundongos conjugado à fluoresceína, produzido em coelhos), por 1 hora, em câmara escura. As lâminas foram lavadas em PBS (2x) e os núcleos foram marcados com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (0,5 µg / ml) por 1 minuto. As lâminas foram montadas com ProLong Gold Antifade (Molecular Probes Inc., Eugene, EUA). Lâminas-controle foram utilizadas para testar a especificidade da imunomarcagem, nas quais o anticorpo primário foi omitido e as lâminas foram incubadas com imunoglobulina G de coelhos ou imunoglobulina M de camundongos. A porcentagem de células positivamente marcadas foi avaliada em 4 áreas do ligamento periodontal: camada cementoblástica, região central do ligamento periodontal, camada osteoblástica e células em contato com o tecido cementário neoformado nos espécimes do Grupo 3. A frequência de cada tipo celular (STRO-1<sup>+</sup> / CEMP-1<sup>+</sup>, STRO-1<sup>+</sup> / CEMP-1<sup>-</sup>, STRO-1<sup>-</sup> / CEMP-1<sup>+</sup> e STRO-1<sup>-</sup> / CEMP-1<sup>-</sup>) foi determinada e os grupos foram comparados entre si por meio do teste exato de Fisher ( $\alpha = 0,05$ ).

### **Cultura celular**

Após aprovação pela Comissão de Ética da Universidade de Michigan, foram coletados pré-molares extraídos por razões ortodônticas, de três pacientes saudáveis, do

gênero masculino, com idade média de 14 anos, provenientes da Clínica de Cirurgia do Departamento de Cirurgia Bucal e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade de Michigan. Os dentes foram transportados em meio de cultura essencial mínimo, modificação alfa ( $\alpha$ -MEM; Gibco® Invitrogen Cell Culture, Carlsbad, EUA) suplementado com penicilina (100  $\mu$ g / ml), estreptomicina (100  $\mu$ g / ml) e anfotericina (1,25 mg / ml) (Gibco® Invitrogen Cell Culture).

No laboratório os dentes foram lavados em PBS e o ligamento periodontal removido do terço médio das raízes dos dentes hígidos, com o auxílio de um bisturi. Os tecidos coletados foram depositados em placas de 60 mm de diâmetro e área de 9,6 cm<sup>2</sup> (BD Falcon™ Cell Culture Plates, BD Biosciences, San Jose, EUA), sob uma lâmina de vidro esterilizada, para obtenção das células do ligamento periodontal por meio de uma técnica de explante (Kapila *et al.*, 1996; Paula-Silva *et al.*, 2009). As culturas foram mantidas em meio  $\alpha$ -MEM suplementado com soro fetal bovino (FBS) a 10%, penicilina (100  $\mu$ g / ml) e estreptomicina (100  $\mu$ g / ml) (Gibco® Invitrogen Cell Culture), em uma incubadora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias até as células atingirem 80% de confluência. A seguir, as células foram tripsinizadas (GIBCO® Trypsin) e utilizadas da terceira a quinta passagem para experimentação. Todos os experimentos foram realizados pelo menos três vezes para cada isolado celular independente.

### **Expressão e purificação da Proteína do Cimento-1**

A proteína do cimento-1 recombinante humana e o anticorpo policlonal anti-CEMP-1 foram gentilmente cedidos pelo Dr. Higinio Arzate da Universidade Nacional Autônoma do México. Sucintamente, para expressão da proteína do cimento-1 recombinante humana, um plasmídeo contendo o vetor pcDNA40-CEMP1(+) foi inserido em fibroblastos gengivais obtidos de humanos e as células passaram a expressar e secretar a proteína (Carmona-Rodríguez *et al.*, 2007; Villareal-Ramírez *et al.*, 2009). O meio de cultura foi coletado e a CEMP-1 recombinante humana foi purificada por meio de cromatografia de afinidade e o perfil confirmado por Western blotting.

### **Tratamento com agentes farmacológicos**

As células do ligamento periodontal foram plaqueadas na densidade de  $1 \times 10^5$  células por poço em placas de cultura de 60 mm e estimuladas com hidróxido de cálcio pró-

análise (Calcium hydroxide puriss. p.a., Sigma), dissolvido em meio livre de soro para experimentos em curto período (6-48 horas) ou em meio suplementado com soro fetal bovino a 1% para experimentos por longo prazo (> 72 horas).

Para os experimentos com inibidores bioquímicos, visando inibir as três vias principais das proteínas quinases ativadoras de mitose (MAPK), as células foram pré-incubadas por 1 hora com os inibidores para (1) proteínas quinases reguladas por sinal extracelular (ERK) (FR180204, EMD Chemicals Inc., San Diego, EUA), (2) p38 MAPK (SB203580, EMD Chemicals Inc.) ou (3) quinase N-terminal c-Jun (SP600125, EMD Chemicals Inc.), dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) para obtenção das curvas dose e tempo-resposta. Com o objetivo de confirmar a participação dos canais de cálcio na sinalização, foi utilizado um bloqueador bioquímico dos canais de cálcio (Methoxyverapamil Hydrochloride, EMD Chemicals Inc.), dissolvido em água destilada e deionizada. Após o pré-tratamento, o meio foi substituído por meio livre de soro contendo o inibidor e o hidróxido de cálcio.

#### **Silenciamento de RNAm para ERK-1 e ERK-2**

As células foram plaqueadas na concentração de  $2 \times 10^5$  células por poço, em placas de 60 mm de diâmetro, utilizando como meio de cultura  $\alpha$ -MEM suplementado com FBS a 10% sem antibióticos. A seguir foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 horas, até que apresentassem 60 a 80% de confluência.

As soluções para transfecção foram preparadas utilizando concentrações de 20 e 60 pmol de silenciadores de RNAm para ERK-1 e ERK-2 (sc-29307 e sc-35335; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA), diluídos em reagente para transfecção lipossolúvel (sc-29528). A monocamada de células aderidas foi lavada com meio de cultura livre de soro (2x) e a seguir as células foram incubadas com a solução para transfecção diluída em meio de cultura livre de soro por 7 horas. Posteriormente foi adicionado meio de cultura com FBS a 20% e antibióticos na concentração de 1 : 1 e as células incubadas por 36 horas. O meio de cultura contendo os silenciadores de RNAm foi removido e as células mantidas em meio livre de soro para experimentação, limitada às 72 horas seguintes.

Como controles foram utilizados silenciadores de RNAm *nontargeting* (sc-36869) ou estimulação com hidróxido de cálcio na ausência de silenciadores de RNAm. A eficácia da transfecção foi confirmada por meio da inibição da expressão de ERK-1 e ERK-2 por Western blotting. A viabilidade celular foi avaliada por meio de um ensaio para mensuração da atividade da enzima desidrogenase mitocondrial.

### **Ensaio de citotoxicidade e proliferação celular**

Para avaliação da citotoxicidade do hidróxido de cálcio, as células foram plaqueadas em meio livre de soro, na concentração de  $5 \times 10^3$  células por poço, em placas de 96 poços e mantidas em incubadora a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 12 horas. Após este período, as culturas foram estimuladas com diferentes concentrações de hidróxido de cálcio por 24 horas. A seguir, 10 µL de um sal tetrazólico solúvel em água {WST-8 [2-(2-methoxy-4nitrophenyl)-3-(4nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)2H]; Dojindo, Gaithersburgh, EUA} foi adicionada a cada poço e as placas foram protegidas da luz e incubadas a 37° C, por 3 horas, em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e umidade relativa de 95%. Após o período de incubação, a absorbância foi determinada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 450 nm. O efeito das diferentes concentrações de hidróxido de cálcio sobre a viabilidade celular foi comparado por meio da análise de variância de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

Para os ensaios de proliferação celular, o número de células foi calculado com base em uma curva-padrão, obtida a partir de um número conhecido de células viáveis. As células foram estimuladas e a atividade da desidrogenase mitocondrial avaliada 6, 12, 24, 36, 48 e 72 horas após o estímulo. Os experimentos foram realizados em sextuplicata para cada isolado celular independente. Os diferentes períodos de avaliação e os diferentes grupos foram comparados entre si por meio da análise de variância de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

### **Ensaio de cicatrização (*Scratch assay, Wound healing assay*)**

Para os ensaios de cicatrização, as células do ligamento periodontal foram plaqueadas na densidade de  $1 \times 10^5$  células por poço, em placas de 96 poços e foi aguardado o espraiamento e adesão por 12 horas, como descrito previamente (Kapila *et al.*, 1997). Decorrido este período, as células na porção central da placa foram removidas utilizando uma ponteira esterilizada e as células foram estimuladas com a proteína do cimento-1 recombinante humana (15 µg / ml) (Álvarez-Pérez *et al.*, 2006), com hidróxido de cálcio (10 mM), com uma combinação dos dois ou com meio de cultura livre de soro. A especificidade da resposta foi testada utilizando-se um anticorpo anti-CEMP-1 esterilizado por filtração ou um bloqueador bioquímico dos canais de cálcio (Methoxyverapamil Hydrochloride).

Para avaliação, as culturas foram examinadas em um microscópio invertido, utilizando o aumento de 4x. Foram realizadas fotografias imediatamente após a remoção

das células e às 6, 12 e 18 horas após o tratamento. A área compreendida entre as bordas da camada de células foi medida e as porcentagens de fechamento das bordas foram calculadas. As áreas foram comparadas entre si nos diferentes períodos experimentais, assim como para os diferentes agentes quimiotáticos, por meio da análise de variância de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Para os experimentos com o bloqueador dos canais de cálcio ou com o anticorpo anti-CEMP-1, os períodos foram comparados entre si por meio da análise de variância de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. No mesmo período, as condições com ou sem bloqueador / anticorpo foram comparadas por meio do teste t de Student ( $\alpha = 0,05$ ).

### **Ensaio de quimotaxia e migração celular**

Ensaio de quimotaxia e migração celular foram realizados utilizando câmaras de migração transmembrana (*transwell*) em associação com um corante fluorescente (Innocyte™ Cell Migration Assay, Calbiochem, San Diego, EUA). Primeiramente o compartimento inferior do aparato contendo 96 poços foi preenchido com os agentes quimiotáticos [CEMP-1 (15  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ), hidróxido de cálcio (10 mM), uma combinação de ambos, soro fetal bovino a 10%] ou meio livre de soro como controle. As células do ligamento periodontal foram resuspensas em meio livre de soro ou em meio livre de soro contendo o bloqueador dos canais de cálcio (20  $\mu\text{M}$ ) ou um anticorpo anti-CEMP-1 (10  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ), na densidade de  $1 \times 10^5$  células por poço, e depositadas no compartimento superior do aparato. A seguir as placas foram incubadas a 37°C por 18 horas.

As placas foram removidas da incubadora e a porção inferior do aparato foi substituída por uma placa de 96 poços contendo 200  $\mu\text{l}$  de uma solução para tripsinização das células que migraram e estavam aderidas à porção inferior da membrana da câmara onde haviam sido depositadas. As placas foram incubadas a 37°C por 30 minutos e a seguir a porção superior do aparato foi descartada. No compartimento inferior restavam as células deslocadas quimicamente, as quais foram marcadas com um corante fluorescente (calceína-AM). De cada poço foram removidos 150  $\mu\text{l}$  e transferidos para uma nova placa de 96 poços para determinação da absorbância em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 485 nm. Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência para estimar a quantidade de células que migraram pelos poros atraídas pelas diferentes substâncias testadas. Os experimentos foram realizados em sextuplicata para cada isolado celular

independente. Os grupos foram comparados entre si por meio da análise de variância de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

### **Imunofluorescência indireta para cultura de células do ligamento periodontal**

Para imunofluorescência indireta, as células foram cultivadas em lâminas de vidro Lab-Tek™ de 8 poços, com área de 0,8 cm<sup>2</sup> cada (Nalge Nunc Int., Rochester, NY, EUA), na densidade de  $2 \times 10^4$  células por poço.

Após experimentação, as células foram fixadas utilizando metanol a -20°C por 5 minutos e secas à temperatura ambiente. A seguir, foram lavadas em PBS (2×) e os sítios de ligação não-específica foram bloqueados com albumina do soro bovino (Sigma) por 30 minutos. As células foram incubadas com anticorpos primários para CEMP-1 (1 : 300) ou STRO-1 (1 : 10), por 1 hora, lavadas em PBS (2×) e incubadas com anticorpo secundário (1:100; anti-IgG de coelhos conjugado ao fluoróforo Texas Red, produzido em cabra ou anti-IgM de camundongos conjugado à fluoresceína, produzido em coelhos) por 1 hora, em câmara escura. As lâminas foram lavadas em PBS (2×) e os núcleos foram marcados após incubação das lâminas com DAPI (0,5 µg / ml) por 1 minuto. As lâminas foram montadas com ProLong Gold Antifade. As células foram fotografadas em um microscópio de fluorescência equipado com uma câmera digital. A porcentagem de células STRO-1<sup>+</sup> foi determinada para cada tratamento realizado e os grupos comparados entre si por meio da análise de variância de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

Para análise da densitometria óptica da marcação da proteína intracelular CEMP-1, foram digitalizadas, em média, 30 células por amostra, em aumento de 100×, para cada grupo. Cada célula foi delineada e a densidade óptica determinada em unidades arbitrárias, utilizando o programa Image J 1.41o (National Institutes of Health, Bethesda, EUA). Os resultados foram expressos como porcentagem de densidade óptica em relação ao controle. Os grupos foram comparados entre si por meio da análise de variância de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

### **Western blotting**

Para extração da proteína total, as células foram coletadas em 1 ml de PBS e centrifugadas a 10.000 g, durante 10 minutos a 4°C, para obtenção do *pellet*. O



sobrenadante foi descartado e o *pellet* resuspenso em 100 µl de solução tampão Ripa (Ripa buffer; Pierce Biotechnology, Rockford, EUA), contendo inibidores de proteases (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha) e inibidores de fosfatases (PhosphoStop, Roche Applied Science). Os tubos foram mantidos em gelo por 20 minutos, centrifugados a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para um novo tubo. A quantidade de proteína total foi estimada pelo ensaio de Bradford (Bio-Rad, Hercules, EUA), utilizando uma curva-padrão determinada a partir da albumina do soro bovino.

Dez a trinta µg de proteína total foram adicionados ao tampão de carregamento (NuPAGE<sup>®</sup> LDS Sample Buffer 4x; Invitrogen) e submetidos à desnaturação a 95°C por 5 minutos. As amostras foram separadas por eletroforese em géis de poliacrilamida de 4 a 12%, dependendo do peso molecular da proteína de interesse, pelo sistema SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Foi utilizado como tampão de corrida MOPS 1x [ácido 3-(N-morfolino)propanosulfônico], com voltagem constante de 200V, por aproximadamente 1 hora. Marcadores de peso molecular foram utilizados como referência (SeeBlue<sup>®</sup> Plus2 Pre-Stained Standard; Invitrogen).

Após a separação das proteínas de acordo com o peso molecular, as mesmas foram eletroforeticamente transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Immobilon<sup>™</sup>-P; Millipore, Billerica, EUA), utilizando como solução-tampão Bis-Tris-HCl e metanol a 20%, em um aparato de transferência semi-úmida, com voltagem constante de 20V, por 60 minutos. Após a transferência, os sítios de ligação não-específica foram bloqueados em salina tamponada com Tris (TBS; StartingBlock<sup>™</sup> TBS Blocking Buffer; Pierce Biotechnology, Rockford, EUA) contendo albumina do soro bovino a 5%, por 1 hora, sob constante agitação. As membranas foram incubadas com anticorpos primários para BSP (1:250; Santa Cruz Biotechnology), CEMP-1 (1:500), CAP (1:500; Santa Cruz Biotechnology), proteína da matriz dentinária-1 (DMP-1) (1:500; Santa Cruz Biotechnology), p44 / 42 MAPK (ERK-1 / ERK-2; 1:1,000; Cell Signaling Technology), fosfo-p44 / 42 MAPK Thr202 / Tyr204 (phospho-ERK-1 / ERK-2; 1:1,000; Cell Signaling Technology) e GAPDH (1:2,000; Santa Cruz Biotechnology), por 12 horas, a 4°C sob constante agitação.

As membranas foram lavadas em TBST por 15 minutos (4x) e, a seguir, incubadas

com anticorpos secundários contra imunoglobulina G (IgG) de camundongos, cabra ou coelho conjugados à *horseradish* peroxidase (Santa Cruz Biotechnology), por 30 minutos, sob agitação, à temperatura ambiente, utilizando concentrações de acordo com a concentração do anticorpo primário utilizado. A seguir, as membranas foram lavadas em TBST por 15 minutos (4×). As bandas foram evidenciadas por quimioluminescência utilizando o sistema de detecção West-Pico Enhanced Chemoluminescence (ECL; Pierce Biotechnology), por 5 minutos seguido pela exposição em filmes radiográficos.

### **Atividade da fosfatase alcalina**

Aos 7 e 14 dias, a atividade de fosfatase alcalina foi determinada por meio da detecção de  $p$ -nitrofenol ( $p$ -NP) após hidrólise do substrato de  $p$ -nitrofenilfosfato ( $p$ NPP), utilizando um *kit* comercial (Sigma). As células foram lisadas em água destilada deionizada por meio de um ultrassom, por 15 segundos, e 300  $\mu$ l do lisado celular foram incubados a 37°C, por 10 minutos, com 150  $\mu$ l do substrato enzimático  $p$ -nitrofenilfosfato (Alkaline Phosphatase Substrate, Sigma), em uma solução tampão a 1,5 mM, pH 10,3 (Alkaline Buffer Solution; Sigma), na concentração de 1 : 1. A reação foi interrompida pela adição de 40  $\mu$ l hidróxido de sódio (NaOH) a 1 N. A seguir, 150  $\mu$ l da reação foram transferidos para cada poço de uma placa de 96 poços e a absorbância foi determinada por meio de um espectrofotômetro, no comprimento de onda de 405 nm, em triplicata. A concentração de  $p$ -nitrofenol foi calculada a partir de uma curva-padrão (0 a 50 mM).

A atividade da enzima fosfatase alcalina foi normalizada em relação ao tempo de incubação e ao conteúdo de proteína total, determinado pela reação de biureto após a redução dos íons cobre presentes na proteína pelo ácido bicinônico (BCA™; Pierce Biotechnology), utilizando uma curva-padrão determinada a partir da albumina do soro bovino. O efeito de diferentes doses de hidróxido de cálcio sobre a atividade da enzima fosfatase alcalina foi avaliado pela comparação entre os grupos por meio da análise de variância de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey em cada período experimental para células mantidas em meio  $\alpha$ -MEM regular ou meio  $\alpha$ -MEM que estimula a mineralização. Para cada concentração de hidróxido de cálcio utilizada, a comparação entre as células mantidas em meio  $\alpha$ -MEM regular ou meio  $\alpha$ -MEM contendo  $\beta$ -glicerofosfato e ácido

ascórbico foi realizada por meio do teste t de Student ( $\alpha = 0,05$ ).

### **Formação de nódulos de mineralização**

A formação de nódulos de mineralização foi avaliada cultivando as células do ligamento periodontal por 7, 14, 21 e 28 dias em meio que favorece a mineralização da matriz extracelular. Este meio consiste de meio  $\alpha$ -MEM suplementado com 10 mM de  $\beta$ -glicerofosfato (Sigma), 50  $\mu$ g / ml de ácido ascórbico (Sigma), soro fetal bovino a 1% e antibióticos.

As células do ligamento periodontal foram plaqueadas na densidade de  $2 \times 10^5$  células por poço, em placas de 60 mm, e aguardou-se a aderência das células por 12 horas. A seguir, o meio de cultura foi removido dos poços e foram adicionadas as seguintes substâncias: (1) hidróxido de cálcio, (2) anticorpo anti-CEMP-1, (3) inibidor bioquímico da fosforilação de ERK-1 / ERK-2 (FR180204) ou (4) meio que favorece a mineralização somente. Como controle, os experimentos foram realizados em meio de cultura  $\alpha$ -MEM regular com a adição das mesmas substâncias descritas para o meio que favorece a mineralização. O meio de cultura foi trocado a cada três dias e a progressão da cultura avaliada por microscopia de fase. No período de 14 dias pós-estimulação o número e a área dos nódulos de mineralização foram mensurados para os espécimes tratados com hidróxido de cálcio em meio de mineralização ou meio que estimula a mineralização somente. Os resultados obtidos foram comparados por meio do teste t de Student ( $\alpha = 0,05$ ).

A multicamada de células juntamente com os nódulos de mineralização depositados foram corados por Vermelho de Alizarina utilizando protocolos descritos previamente (Wang *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2009). Suscintamente, as culturas foram fixadas com etanol a 70% por 10 minutos e coradas com uma solução de Vermelho de Alizarina a 2%, pH 4,0 (Sigma), por 5 minutos à temperatura ambiente. A quantificação do acúmulo de cálcio no meio extracelular foi realizada após a liberação do cálcio ligado ao corante obtido pelo tratamento com 100 mM de cloreto de cetilpiridíneo (Sigma), durante 1 hora, sob constante agitação. A absorbância do corante liberado foi determinada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 570 nm, e normalizada pelo conteúdo de proteína total na cultura determinada pelo método BCA.

Para os experimentos dose- e tempo-resposta, o conteúdo de vermelho de alizarina nas culturas estimuladas ou não com hidróxido de cálcio foi mensurado e os grupos comparados entre si por meio da análise de variância de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Para a determinação do efeito da utilização do anticorpo anti-CEMP-1 e do inibidor bioquímico da fosforilação de ERK-1 e ERK-2, os grupos estimulados ou não com hidróxido de cálcio e estimulados ou não com os medicamentos foram comparados entre si por meio da análise de variância de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

Para marcação dual com Vermelho de Alizarina e imunofluorescência indireta para CEMP-1, as células foram fixadas em etanol a 70% por 1 hora a 4°C. Após a lavagem com PBS, as culturas foram processadas para marcação para CEMP-1 primeiramente, seguido pela marcação para Vermelho de Alizarina, como descrito previamente (Oliveira *et al.*, 2007).

## RESULTADOS

### ***O tratamento com hidróxido de cálcio induz a diferenciação de células do ligamento periodontal em células com um fenótipo de cementoblastos e promove mineralização in vivo***

*In vivo*, foi observada a deposição de um tecido mineralizado semelhante ao cimento no forame apical em dentes submetidos ao tratamento endodôntico utilizando hidróxido de cálcio como curativo de demora (Figuras 3.1A, 3.1E). Em algumas regiões era possível identificar uma linha bem definida separando o tecido neoformado do cimento estrutural (Figura 3.1I, seta). Essa deposição de tecido mineralizado não foi observada nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única e estava presente em estágio inicial de mineralização em dentes com vitalidade pulpar submetidos ao tratamento endodôntico. A partir destes resultados nós elaboramos a hipótese de que o hidróxido de cálcio poderia estar relacionado a diferenciação celular e posterior deposição do tecido mineralizado observado no ápice radicular.

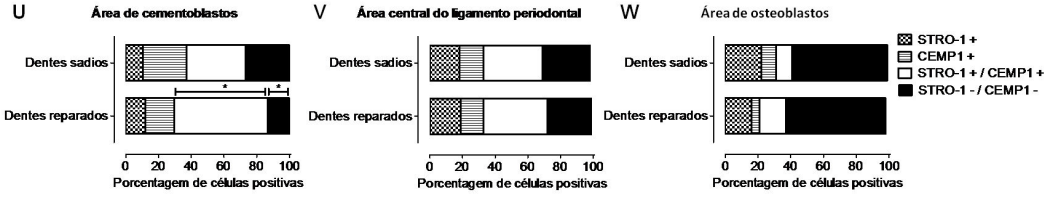
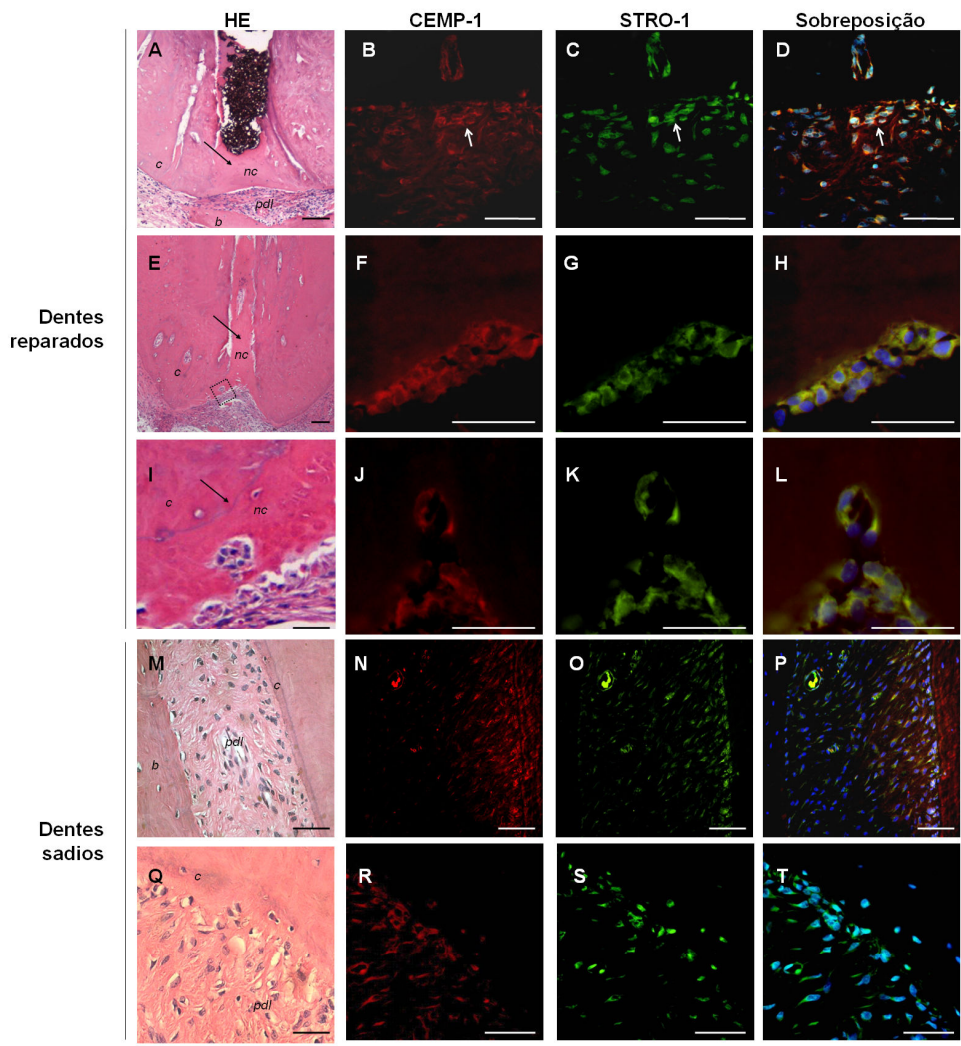
Nos dentes reparados apicalmente pelo tratamento com hidróxido de cálcio, as células em contato com o tecido cementóide expressavam a proteína do cimento-1 (CEMP-1), um marcador da diferenciação cementoblástica (Álvarez-Pérez *et al.*, 2006) (Figuras 3.1B,

3.1F, 3.1J). Nos dentes com vitalidade pulpar, não submetidos ao tratamento endodôntico, células adjacentes ao cimento também expressavam CEMP-1 (Figuras 3.1N, 3.1R). Adjacente ao cimento em dentes sadios ou ao tecido cementóide recém-depositado em dentes submetidos ao tratamento endodôntico, havia uma grande quantidade de células positivamente marcadas para CEMP-1 e gradualmente essa quantidade de células diminuía em direção ao centro do ligamento periodontal e osso alveolar (Figuras 3.1U, 3.1V, 3.1W).

Como a origem destas células que alinham o tecido cementóide neoformado é desconhecida, nós testamos a hipótese de que essas células poderiam ser derivadas de células mesenquimais progenitoras presentes no ligamento periodontal. Assim, os tecidos foram imunomarcados para o receptor de superfície STRO-1, um marcador conhecido para células mesenquimais progenitoras (Seo *et al.*, 2004). Tanto em dentes com vitalidade pulpar não submetidos ao tratamento endodôntico como em dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora, foram detectadas altas porcentagens de células que expressavam o receptor de superfície STRO-1. Observou-se grande quantidade dessas células localizadas próximo ao cimento radicular e apenas um pequeno número de células positivas próximas ao osso alveolar (Figuras 3.1C, 3.1G, 3.1K, 3.1O, 3.1S).

No ligamento periodontal, as marcações positivas para STRO-1 estavam co-localizadas às marcações positivas para CEMP-1, em diversas células, em dentes com vitalidade pulpar (Figuras 3.1P, 3.1T). Em dentes submetidos ao tratamento de canais radiculares, uma maior quantidade de células positivas simultaneamente para STRO-1 e CEMP-1 foi observada na região de células semelhantes a cementoblastos, se comparada aos cementoblastos presentes em dentes sadios (Figuras 3.1D, 3.1H, 3.1L, 3.1P, 3.1T, 3.1U). O osso alveolar propriamente dito e os osteoblastos alinhados ao osso não apresentavam marcação para STRO-1 ou CEMP-1. Lâminas-controle incubadas com imunoglobulina G de coelho ou imunoglobulina M de camundongo não apresentaram marcação não-específica. A co-localização de células positivas para STRO-1 e CEMP-1 próximo ao neocimento indicaram a presença de células progenitoras de cementoblastos na área apical reparada e uma possível relação entre CEMP-1 e STRO-1.

**Figura 3.1.** O tratamento com hidróxido de cálcio induz a diferenciação de células do ligamento periodontal em células com um fenótipo de cementoblastos e promove mineralização *in vivo*. O hidróxido de cálcio estimulou a deposição de um tecido cementóide no forame apical *in vivo* (**A, E, I**-setas; **I**- maior aumento do retângulo em **E**). As células alinhadas ao tecido neoformado foram marcadas positivamente para a proteína do cimento-1 (CEMP-1), um marcador específico de cementoblastos (**B, F, J**) e para STRO-1, um receptor de superfície indicador da linhagem mesenquimal progenitora (**C, G, K**). DAPI foi utilizado como marcar nuclear (**D, H, L**). Cimento (c), ligamento periodontal (pdl) e osso (b) em dentes saudáveis utilizados como controle (**M, N, O, P, Q, R, S, T**). Gráficos mostram a porcentagem de células STRO-1<sup>+</sup>/CEMP-1<sup>-</sup>, STRO-1<sup>+</sup>/CEMP-1<sup>+</sup>, STRO-1<sup>-</sup>/CEMP-1<sup>+</sup> e STRO-1<sup>-</sup>/CEMP-1<sup>-</sup>, as quais foram quantificadas em três áreas do ligamento periodontal: nas regiões (**U**) próxima ao dente, (**V**) no centro do ligamento periodontal e (**W**) próxima ao osso alveolar. n = 5; Barra = 50 µm; \*  $p < 0,05$  comparado aos dentes saudáveis.

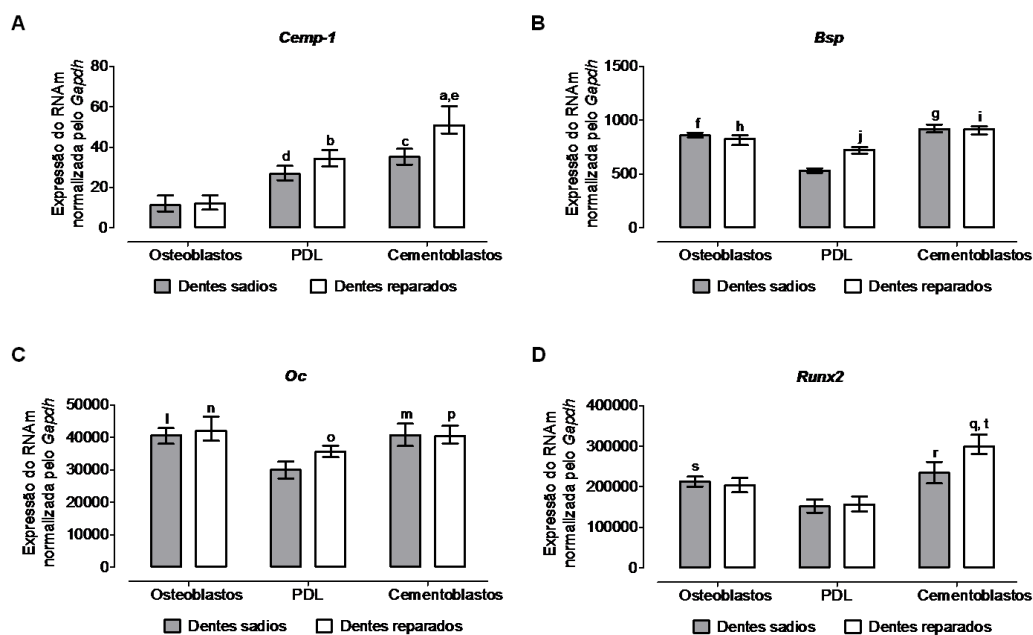


Para confirmar se as células localizadas próximas ao cimento apresentavam um fenótipo de células capazes de mineralização, foi avaliada a expressão gênica de RNAm para *Cemp-1*, *Bsp*, *Oc* e para o fator de transcrição *Runx2*. Para tanto, células em três regiões do ligamento periodontal (próximo ao cimento, no centro do ligamento periodontal e próximo ao osso alveolar) foram cortadas e coletadas por meio de microdissecção a laser e a avaliação gênica realizada por meio de RT-PCR em tempo real.

Alta expressão de RNAm para *Cemp-1* foi observada na região próxima ao cimento e no centro do ligamento periodontal, comparado com a região de osteoblastos, onde baixa expressão para *Cemp-1* foi detectada. Ainda, em dentes reparados pelo uso do hidróxido de cálcio, a expressão gênica de *Cemp-1* foi significativamente mais alta na região mais próxima ao neocimento do que em dentes com vitalidade pulpar não submetidos ao tratamento endodôntico (Figura 3.2A). Expressão de genes para sialoproteína óssea e osteocalcina foram detectados em maior quantidade próximo ao cimento e ao osso alveolar, indicando a presença de células com um fenótipo de mineralização nessas regiões, tanto em dentes saudios quanto naqueles que se encontravam reparados após tratamento de canais radiculares (Figuras 3.2B, 3.2C). De modo semelhante, a expressão do fator de transcrição *Runx2* foi maior em células próximas ao cimento e ao osso alveolar, comparado àquelas células no centro do ligamento periodontal. As células próximas ao neocimento em dentes reparados expressavam mais *Runx2* do que as células próximas ao cimento em dentes saudios (Figura 3.2D).

Juntos, a maior expressão da proteína do cimento-1 e a maior expressão de RNAm para proteínas que são características de um fenótipo celular associado à mineralização, observados próximo ao tecido cementóide neoformado, indicam a presença de um fenótipo cementoblástico nas células ao redor do ápice dental, nos dentes submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora. Este padrão de expressão de transcritos para marcadores de mineralização foi similar àquele observado em células próximas ao cimento em dentes saudios, inclusive com maior expressão de *Cemp-1* e *Runx2* nas células em contato com as áreas reparadas.





**Figura 3.2.** *In vivo*, o fenótipo cementoblástico próximo ao neocimento formado em dentes reparados pelo uso do hidróxido de cálcio é confirmado pelo aumento da expressão de genes para proteínas relacionadas à mineralização. Células das 3 regiões do ligamento periodontal (próxima ao dente, no centro do ligamento periodontal e próximo ao osso alveolar) foram cortadas e coletadas por meio de microdissecção a laser, o RNAm foi isolado e a expressão de *Cemp-1* (A), sialoproteína óssea (*Bsp*) (B), osteocalcina (*Oc*) (C) e *Runx2* (D) foram determinados por meio de RT-PCR em tempo real. *Gapdh* foi usado como controle interno. Diferenças estatisticamente significantes estão indicadas por: a, b, q- comparado à área de osteoblastos reparada; c, d- comparado à área de osteoblastos em dentes saudáveis; e, t- comparado à área de cementoblastos em dentes saudáveis; f, g, h, i, j, l, m, o, r, s- comparado à área central do ligamento periodontal em dentes saudáveis; h, i, n, p- comparado à área central do ligamento periodontal em dentes reparados;  $p < 0,05$ ;  $n = 5$ .

### **A proteína do cimento-1 (CEMP-1) está envolvida na proliferação, migração e diferenciação de células do ligamento periodontal e mineralização *in vitro***

Uma vez que a expressão de CEMP-1 estava co-localizada com a presença do tipo celular STRO-1 positivo e, *in vivo*, maior expressão de CEMP-1 foi observada na região de deposição cementária em dentes tratados com hidróxido de cálcio, nós investigamos se a CEMP-1 ou hidróxido de cálcio poderiam ser fatores quimiotáticos para células que expressam o receptor de superfície STRO-1.

As células do ligamento periodontal foram plaqueadas em alta densidade, esperou-se a adesão dessas células à placa de cultura e uma pequena quantidade de células foi removida da placa utilizando uma ponteira esterilizada. A seguir as células foram estimuladas com a proteína do cimento-1 recombinante humana, hidróxido de cálcio, uma combinação de ambos, ou meio sem soro. A CEMP-1, o hidróxido de cálcio ou a combinação

de ambos estimularam a migração celular e aproximação das bordas da multicamada de células 18 horas após o tratamento, diferentemente das células mantidas em meio de cultura sem soro. A combinação de CEMP-1 e hidróxido de cálcio promoveu migração celular mais rapidamente às 6 e 12 horas pós-estimulação comparado ao tratamento com hidróxido de cálcio somente.

Para testar a especificidade da resposta, as células foram pré-incubadas com um anticorpo anti-CEMP-1 que bloqueia a atividade da proteína ou com um medicamento bloqueador dos canais de cálcio que impede a entrada de cálcio no interior da célula. O anticorpo anti-CEMP-1 e o bloqueador de canais de cálcio impediram a migração celular que havia sido estimulada pela proteína do cemento-1 recombinante humana e pelo hidróxido de cálcio, respectivamente, confirmando que ambos são importantes para a migração celular e aproximação das bordas da monocamada de células *in vitro* (Figura 3.3A).

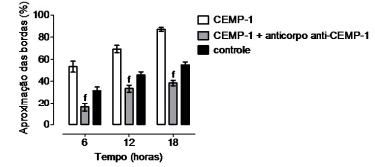
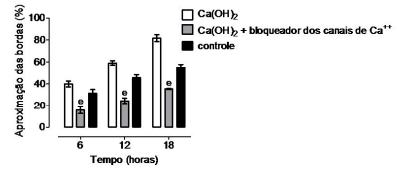
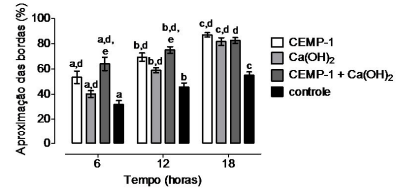
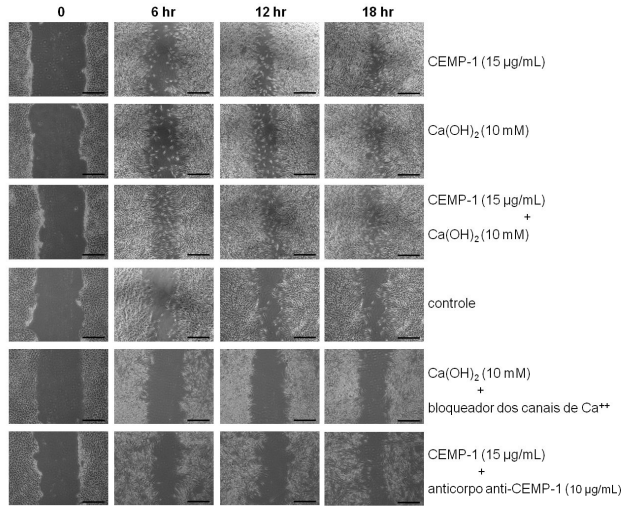
Utilizando um ensaio de migração transmembrana no qual as células são depositadas no compartimento superior de uma placa de 96 poços e os agentes quimiotáticos no compartimento inferior e esses compartimentos são separados por uma membrana permeável com poros de 8  $\mu\text{m}$  de diâmetro, os resultados obtidos previamente foram confirmados. Todos os agentes quimiotáticos testados induziram maior migração celular comparado com o meio de cultura sem soro. Quando foram utilizados o medicamento bloqueador de canais de cálcio ou o anticorpo anti-CEMP-1 houve inibição da migração celular (Figura 3.3B).

Dezoito horas após a estimulação das células do ligamento periodontal, as células no teste de cicatrização foram marcadas utilizando um anticorpo anti-STRO-1. O tratamento com CEMP-1 estimulou a migração de uma maior quantidade de células que expressavam STRO-1, comparado com as células estimuladas com hidróxido de cálcio (Figura 3.3D). O tratamento com uma combinação de CEMP-1 e hidróxido de cálcio estimulou a migração de uma quantidade semelhante de células positivas para STRO-1 àquela obtida pelo tratamento com CEMP-1 isoladamente.

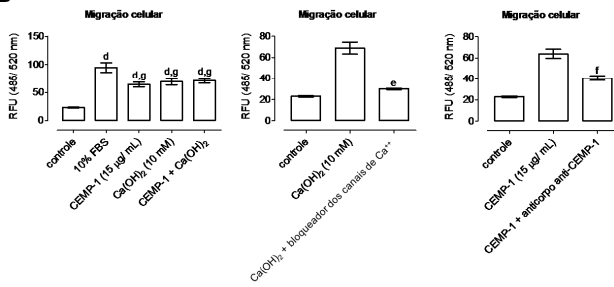
Ainda, o tratamento com a proteína do cemento-1 recombinante humana estimulou a proliferação celular a partir de 6 até 72 horas após o tratamento, enquanto o hidróxido de cálcio não exerceu nenhum efeito até 36 horas após a estimulação. Após 48 a 72 horas, o hidróxido de cálcio inibiu a proliferação celular, se comparado ao controle estimulado com meio sem soro (Figura 3.3C). A utilização da proteína recombinante associada ao hidróxido de cálcio estimulou a proliferação celular até 36 horas, porém após esse período, a proliferação celular foi semelhante ao controle. Estes resultados sugerem funções distintas para o hidróxido de cálcio e para a proteína do cemento-1 no processo de reparo observado *in vivo*.

**Figura 3.3.** A proteína do cimento-1 (CEMP-1) está envolvida na proliferação e migração de células do ligamento periodontal de humanos. **(A)** Um ensaio de cicatrização (*wounding assay*) foi utilizado para avaliar a migração de células do ligamento periodontal 0, 6, 12 e 18 horas após estimulação com CEMP-1 recombinante humana, hidróxido de cálcio, CEMP-1 + hidróxido de cálcio ou meio  $\alpha$ MEM sem soro (controle). CEMP-1 e hidróxido de cálcio promoveram a migração celular, a qual foi inibida quando a atividade de CEMP-1 foi bloqueada por um anticorpo anti-CEMP-1 ou um medicamento bloqueador dos canais de cálcio. Os gráficos representam a porcentagem de aproximação das bordas da multicamada de células (*wound closure*) com o decorrer do tempo. Barra = 500 $\mu$ m. Diferenças estatisticamente significantes estão indicadas por: a- comparado a 0 hora; b- comparado a 6 horas; c- comparado a 12 horas; d- comparado ao controle; e- comparado à estimulação com hidróxido de cálcio isolada; f- comparado à estimulação com CEMP-1 isolada; n = 3;  $p < 0,05$ . **(B)** Os resultados foram confirmados por meio de um ensaio quantitativo para migração celular por meio do uso de um corante fluorescente (calceína-AM); g- comparado ao meio com soro fetal bovino a 10%; n = 6;  $p < 0,05$ . **(C)** A proliferação celular foi avaliada por meio de um ensaio baseado na atividade da enzima desidrogenase mitocondrial para os períodos de tempo indicados após tratamento com CEMP-1 recombinante humana, hidróxido de cálcio, CEMP-1 + hidróxido de cálcio ou meio sem soro; n = 3;  $*p < 0,05$ . **(D)** Após 18 horas, as células no teste de cicatrização foram imunomarcadas para STRO-1, um receptor presente em células da linhagem mesenquimal progenitora. Gráficos representam a porcentagem de células STRO-1 positivas no campo de visão para cada tratamento. Barra = 50 $\mu$ m. Diferenças estatisticamente significantes estão indicadas por: h- comparado à estimulação com hidróxido de cálcio isolada; i- comparado ao controle; n = 6;  $p < 0,05$

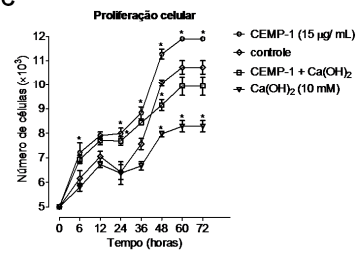
**A**



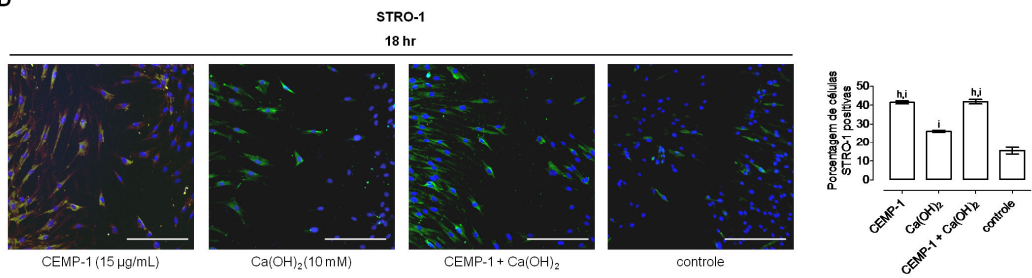
**B**



**C**



**D**



Para investigar se a proteína do cemento-1 está envolvida na mineralização de células do ligamento periodontal, assim como está em células derivadas de cementoblastomas (Álvarez-Pérez *et al.*, 2003) ou em fibroblastos gengivais mutantes que expressam CEMP-1 (Carmona-Rodríguez *et al.*, 2007; Villarreal-Ramírez *et al.*, 2009), as células do ligamento periodontal de humanos foram estimuladas com meio contendo  $\beta$ -glicerofosfato e ácido ascórbico com ou sem hidróxido de cálcio na presença ou não de anticorpo anti-CEMP-1.

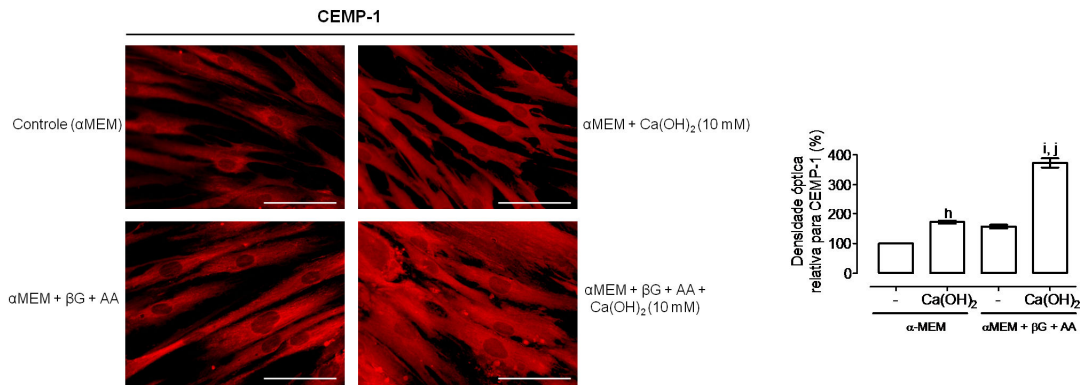
As células cultivadas em meio  $\alpha$ MEM mantiveram sua morfologia fusiforme, enquanto que as células mantidas em concentrações elevadas de hidróxido de cálcio perderam sua morfologia fibroblástica inicial e passaram a exibir uma morfologia ovalada, com projeções citoplasmáticas curtas (Figura 3.4B). As mudanças na morfologia celular juntamente com a expressão aumentada de proteínas relacionadas à mineralização podem ser consideradas indicadores da diferenciação cementoblástica (Yang *et al.*, 2009).

Uma maior quantidade de nódulos de mineralização foram depositados em células estimuladas com hidróxido de cálcio, comparado às células mantidas em meio de cultura sem hidróxido de cálcio (Figura 3.4Ba, 3.4Bd). A área dos nódulos de mineralização também foi maior nas culturas estimuladas com hidróxido de cálcio (Figura 3.4B). As células ao redor dos nódulos nas duas condições expressavam CEMP-1 (Figuras 3.4Bb, 3.4Be), porém à distância dos nódulos, mais células expressavam CEMP-1 no grupo tratado com hidróxido de cálcio comparado com o grupo sem hidróxido de cálcio (Figuras 3.4Bc, 3.4Bf). A intensidade da expressão de proteína do cemento-1 foi avaliada por densidade óptica e foi maior nas células estimuladas com hidróxido de cálcio em meio que favorece a mineralização (Figura 3.4A).

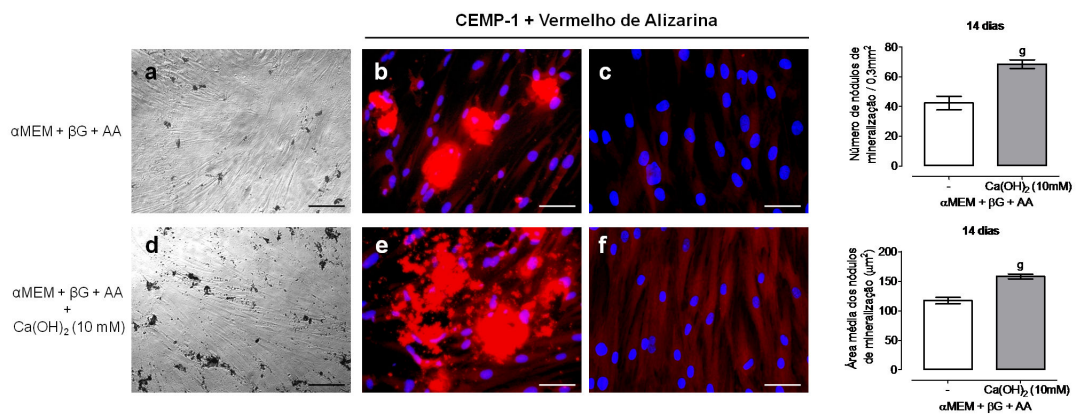
A mineralização foi maior quando houve adição de hidróxido de cálcio ao meio de cultura (Figura 3.4C), entretanto quando as células foram incubadas com hidróxido de cálcio juntamente com um anticorpo anti-CEMP-1, o qual bloqueia a atividade da proteína, menor quantidade de mineralização foi observada. Células incubadas em meio regular não apresentaram nódulos de mineralização enquanto células incubadas em meio que favorece a mineralização e imunoglobulina G de coelhos mostraram níveis de mineralização semelhantes à adição de  $\beta$ -glicerofosfato e ácido ascórbico ao meio, indicando que o bloqueio da atividade da proteína pelo anticorpo anti-CEMP-1 não acontece em função da presença e / ou toxicidade de imunoglobulinas, mas sim pelo bloqueio da atividade da proteína CEMP-1.

**Figura 3.4.** O hidróxido de cálcio estimula a expressão de CEMP-1, a qual está envolvida na formação de nódulos de mineralização. **(A)** As células do ligamento periodontal foram cultivadas em meio  $\alpha$ MEM suplementado ou não com hidróxido de cálcio (10 mM) ou em meio  $\alpha$ MEM contendo 10 mM de  $\beta$ -glicerofosfato ( $\beta$ G) e 50  $\mu$ g / ml de ácido ascórbico (AA), suplementado ou não com hidróxido de cálcio por 14 dias. As células foram imunomarcadas para CEMP-1 utilizando um anticorpo secundário conjugado ao fluoróforo *Texas-Red*. O gráfico apresenta a intensidade de fluorescência avaliada por meio de análise da densidade óptica intracelular. Barra = 15  $\mu$ m. Diferenças estatisticamente significantes estão indicadas por: h- comparado ao meio  $\alpha$ MEM; i- comparado ao meio  $\alpha$ MEM contendo  $\beta$ G e AA; j- comparado ao meio  $\alpha$ MEM + hidróxido de cálcio; n = 30;  $p < 0,05$ . **(B)** Os nódulos de mineralização foram contados em microscopia de luz convencional (a, d; barra = 100  $\mu$ m) e a área de cada nódulo foi mensurada utilizando o *Software Image J*. A seguir, os nódulos foram corados com Vermelho de Alizarina, imunomarcados para CEMP-1, e fotografias foram tomadas em áreas adjacentes aos (b, e) e distantes dos (c, f) nódulos de mineralização. Barra = 20  $\mu$ m; g- comparado ao meio  $\alpha$ MEM contendo  $\beta$ G e AA; n = 3;  $p < 0,05$ . **(C)** As células do ligamento periodontal foram cultivadas por 28 dias em meio  $\alpha$ MEM contendo  $\beta$ G e AA, suplementados ou não com hidróxido de cálcio, e a atividade de CEMP-1 foi bloqueada utilizando um anticorpo policlonal anti-CEMP-1 produzido em coelhos. Imunoglobulina G (IgG) de coelho foi usada como controle. O gráfico mostra o conteúdo de Vermelho de Alizarina quantificado por espectrofotometria. Diferenças estatisticamente significantes estão indicadas por: l- comparado ao meio  $\alpha$ MEM; m- comparado ao tratamento com anticorpo anti-CEMP-1 em meio  $\alpha$ MEM contendo  $\beta$ G e AA; n- comparado ao meio  $\alpha$ MEM contendo  $\beta$ G e AA; o- comparado ao tratamento com anticorpo anti-CEMP-1 em meio  $\alpha$ MEM contendo  $\beta$ G e AA suplementado com hidróxido de cálcio; n = 3;  $p < 0,05$ .

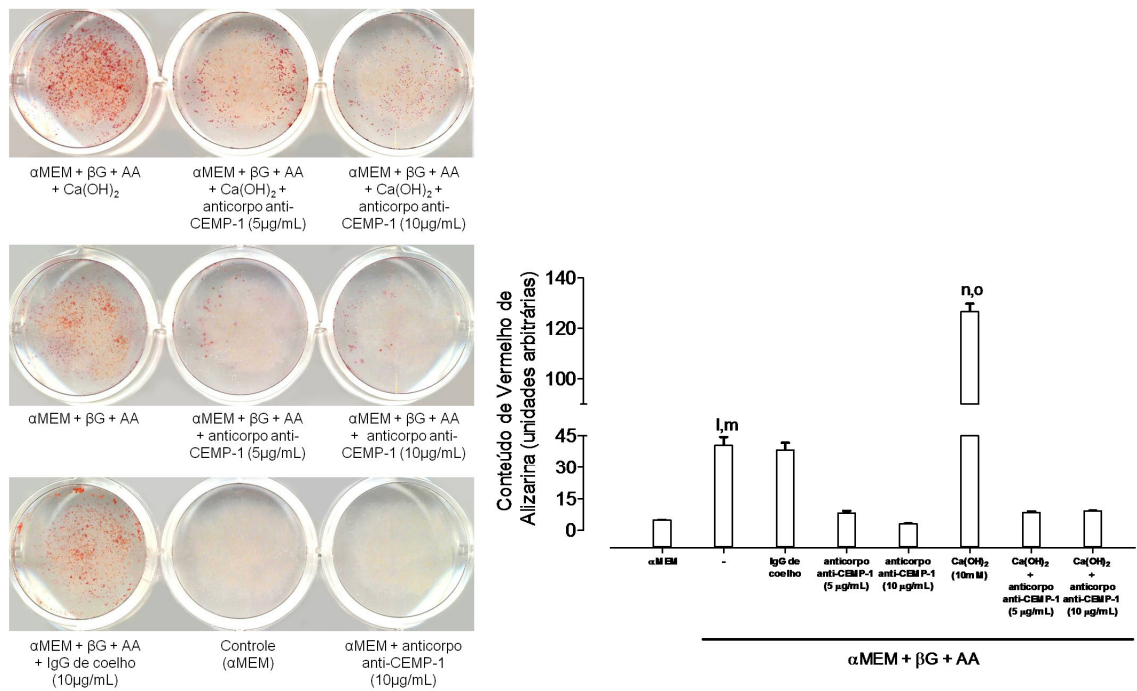
**A**



**B**



**C**



***O aumento na concentração extracelular de cálcio leva ao aumento da expressão de proteínas específicas de cementoblastos e mineralização***

Para entender a função do hidróxido de cálcio na diferenciação de células do ligamento periodontal, a expressão de proteínas associadas à mineralização em culturas estimuladas com hidróxido de cálcio por curto e longo prazo foi investigada. Para avaliação da viabilidade celular em contato com o medicamento, as células do ligamento periodontal foram estimuladas com 1 a 20 mM de hidróxido de cálcio por 24 horas (Figura 3.5A). Nestas concentrações o hidróxido de cálcio é solúvel em água e foi dissolvido em meio  $\alpha$ MEM sem soro. Com o aumento da concentração de hidróxido de cálcio houve uma redução dose-dependente da viabilidade celular. Até 15 mM de hidróxido de cálcio, mais de 90% das células estavam viáveis e concentrações menores do que esta foram selecionadas para os experimentos subsequentes.

Diferentes concentrações de hidróxido de cálcio estimularam a expressão de proteínas relacionadas à mineralização por células do ligamento periodontal. A expressão de CAP foi pouco influenciada pela presença do hidróxido de cálcio 6, 12 e 24 horas após estimulação (Figura 3.5B), porém efeitos mais robustos puderam ser observados aos 3, 7 e 14 dias da cultura mantida em altas concentrações de hidróxido de cálcio (Figura 3.5C). A expressão da proteína CEMP-1 não foi detectada 6 horas após estimulação com hidróxido de cálcio, porém foi detectada 12 horas após a estimulação, sem ser evidenciada no grupo controle (Figura 3.5B). Vinte e quatro horas após estimulação com baixas doses de hidróxido de cálcio não houve alteração da expressão basal de CEMP-1, enquanto 10 mM do medicamento levou a pequena indução da expressão da proteína. Novamente, efeitos mais robustos foram observados após 3, 7 e 14 dias da cultura. Aos 14 dias, a expressão de CEMP-1 foi mais alta para as células tratadas com hidróxido de cálcio, independentemente da concentração utilizada (Figura 3.5C). Padrões similares foram observados para a proteína da matriz dentinária-1.

A expressão basal de sialoproteína óssea foi detectada nas células do ligamento periodontal durante todo o período experimental e o hidróxido de cálcio exerceu pouca influência na expressão da proteína em períodos curtos de cultura, após 6, 12 e 24 horas (Figura 3.5B). Aos 3 e 7 dias da cultura, uma resposta dose-dependente foi observada (Figura

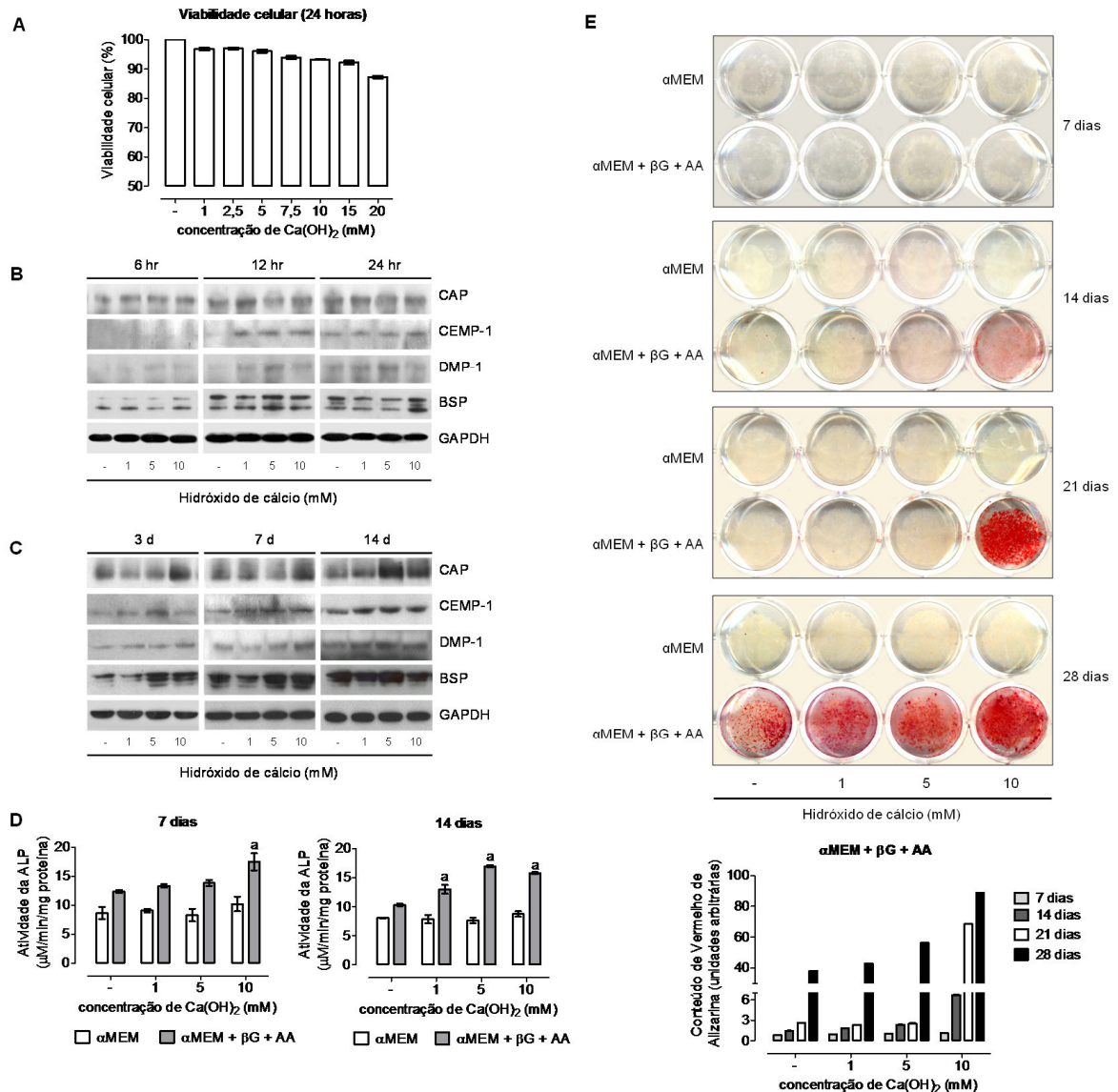


3.5C) e aos 14 dias, não houve diferença na expressão de sialoproteína óssea entre as células tratadas com hidróxido de cálcio e células-controle mantidas em meio  $\alpha$ MEM sem soro.

Com o objetivo de investigar a diferenciação cementoblástica induzida pelo hidróxido de cálcio, células do ligamento periodontal de humanos foram cultivadas em contato com o medicamento por 7 e 14 dias e a atividade da enzima fosfatase alcalina foi avaliada (Figura 3.5D). Os resultados obtidos confirmaram o efeito estimulador do hidróxido de cálcio na atividade da enzima. As células cultivadas em meio  $\alpha$ -MEM contendo  $\beta$ -glicerofosfato, ácido ascórbico e suplementadas com hidróxido de cálcio apresentaram maior atividade da enzima fosfatase alcalina aos 7 e 14 dias da cultura comparado às células cultivadas em meio  $\alpha$ -MEM contendo  $\beta$ -glicerofosfato e ácido ascórbico sem hidróxido de cálcio. O hidróxido de cálcio em meio de cultura  $\alpha$ -MEM não induziu o aumento da enzima fosfatase alcalina.

A formação de nódulos de mineralização foi observada 14 e 21 dias após tratamento com hidróxido de cálcio, enquanto que células mantidas em meio  $\alpha$ -MEM suplementado com  $\beta$ -glicerofosfato e ácido ascórbico sem hidróxido de cálcio não exibiram nódulos de mineralização detectáveis pela coloração com Vermelho de Alizarina (Figura 3.5E). Essa resposta foi tempo-dependente e no vigésimo oitavo dia da cultura um efeito dose-resposta foi observado.

Em conjunto, estes resultados mostraram que o hidróxido de cálcio estimulou a expressão de proteínas relacionadas à mineralização, a atividade da enzima fosfatase alcalina e mineralização em maior intensidade, comparado com células que não foram estimuladas com hidróxido de cálcio. Estes resultados confirmam a importância do hidróxido de cálcio na diferenciação de células do ligamento periodontal em cementoblastos *in vitro*.



**Figura 3.5.** Elevação da concentração extracelular de cálcio leva a maior expressão de proteínas cementoblasto-específicas e induz a mineralização. **(A)** A viabilidade das células do ligamento periodontal foi avaliada 24 horas após tratamento com diferentes concentrações de hidróxido de cálcio por meio de um ensaio que detecta a atividade da enzima desidrogenase mitocondrial; n = 6. **(B)** As células do ligamento periodontal foram estimuladas com 1, 5 ou 10 mM de hidróxido de cálcio em meio αMEM sem soro por 6, 12 e 24 horas (ensaio de curto prazo), ou **(C)** em meio αMEM contendo 1% de soro fetal bovino por 3, 7 e 14 dias (ensaio de longo prazo). A expressão de CEMP-1 (50 kDa), CAP (56 kDa), DMP-1 (57 kDa) e BSP (70 kDa) foi determinada por Western blotting. GAPDH (37 kDa) foi usado como controle interno; n = 3. **(D)** A atividade da enzima fosfatase alcalina foi determinada aos 7 e 14 dias da cultura pós-tratamento com hidróxido de cálcio; a-  $p < 0,05$  comparado ao meio αMEM tempo e dose-pareados; n = 3. **(E)** A formação de nódulos de mineralização foi avaliada por meio de coloração com Vermelho de Alizarina aos 7, 14, 21 e 28 dias após cultivo das células do ligamento periodontal em meio αMEM ou meio αMEM contendo βG + AA, suplementados ou não com hidróxido de cálcio. O gráfico mostra a quantificação do conteúdo de Vermelho de Alizarina; n = 3.

***A expressão de proteínas específicas de cementoblastos é regulada por sinalização via proteínas quinases reguladas por sinal extracelular***

Como já foi salientado, a função dos íons cálcio na mineralização da matriz extracelular é bastante estudada, porém os mecanismos pelos quais o aumento na concentração de cálcio extracelular leva a expressão de proteínas associadas à mineralização ainda é desconhecido. Dessa maneira, nós avaliamos a função do hidróxido de cálcio na regulação de CAP e CEMP-1, proteínas consideradas específicas de cementoblastos (Arzate *et al.*, 1992; BarKana *et al.*, 2000; Alvarez-Pérez *et al.*, 2006). Ainda, sabendo que as proteínas quinases ativadoras de mitose medeiam a expressão de CEMP-1 em cementoblastos (Kajiya *et al.*, 2008), nós inibimos as três principais vias quinases desse grupo (ERK- proteínas quinases reguladas por sinal extracelular, p38 e quinase c-Jun N-terminal) para determinar se elas estavam envolvidas na diferenciação de células do ligamento periodontal em cementoblastos.

O tratamento com hidróxido de cálcio estimulou a expressão de CAP e CEMP-1 como previamente demonstrado. O bloqueador bioquímico das quinases reguladas por sinal extracelular (ERK-1 e ERK-2) bloqueou a expressão de CAP e CEMP-1 enquanto os bloqueadores de p38 e JNK não exerceram nenhum efeito detectável por Western blotting (Figura 3.6A), indicando que o hidróxido de cálcio estimula a expressão de CAP e CEMP-1 via ERK. Para confirmar se a via ERK está ativada durante a resposta, experimentos tempo-dependentes foram conduzidos para avaliar o grau de fosforilação de ERK após tratamento com hidróxido de cálcio. O tratamento com hidróxido de cálcio estimulou a fosforilação de ERK-1 e ERK-2 de modo tempo-dependente, com o pico de fosforilação de 30 a 45 minutos após estimulação e desfosforilação a seguir. A avaliação após 12 horas, ou seja, em longo prazo, confirmou o padrão cíclico de fosforilação de ERK após tratamento com hidróxido de cálcio (Figura 3.6B). Os níveis totais de ERK permaneceram inalterados nas duas condições.

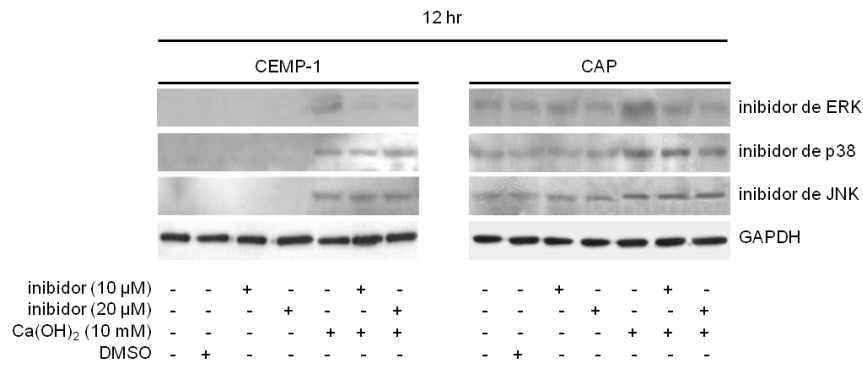
Para confirmar se a regulação de CAP e CEMP-1 é mediada via quinases reguladas por sinal extracelular, a expressão de ERK-1 e ERK-2 foi inibida utilizando silenciadores de RNA (Figura 3.6C). A hipótese foi confirmada uma vez que a supressão simultânea de ERK-1 e ERK-2 e estimulação com hidróxido de cálcio resultou na inibição de CAP e CEMP-1, comparado com a estimulação com hidróxido de cálcio isoladamente. A inibição da fosforilação de ERK-1 e ERK-2 por meio de um inibidor bioquímico também impediu a

mineralização quando as células foram estimuladas com hidróxido de cálcio em meio que favorece a mineralização (Figura 3.6D).

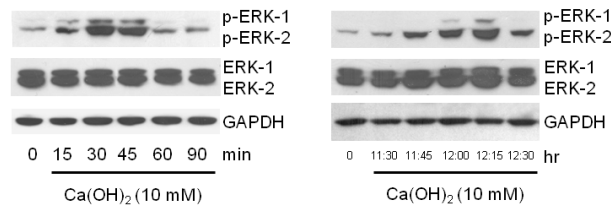
O aumento intracelular na concentração de íons cálcio, liberados a partir do retículo endoplasmático, após tratamento com ionomicina, leva à fosforilação de ERK (Chuderland *et al.*, 2008). Para avaliar se o aumento da concentração extracelular de cálcio influencia a diferenciação celular via ERK, nós avaliamos se aumentando simultaneamente a concentração extracelular de cálcio e bloqueando sua entrada na célula havia fosforilação de ERK e síntese de CAP e CEMP-1. O bloqueio inespecífico dos canais de cálcio, na presença do hidróxido de cálcio, levou a um menor grau de fosforilação de ERK comparado com células tratadas com hidróxido de cálcio sem bloqueio dos canais de cálcio. O tratamento com medicamento bloqueador dos canais de cálcio por 12 horas levou a uma diminuição dose-dependente da expressão de CEMP-1 e menor expressão de CAP, confirmando a importância dos íons cálcio no processo de diferenciação celular (Figura 3.6E).

**Figura 3.6.** A expressão de proteínas específicas de cementoblastos é regulada por sinalização via proteínas quinases reguladas por sinal extracelular. **(A)** As células do ligamento periodontal foram pré-incubadas com inibidores bioquímicos para as proteínas quinases ativadoras de mitose (MAPK): ERK (FR180204), p38 (SB203580) e quinase c-Jun N-terminal (SP600125). A seguir as células foram estimuladas com meio de cultura sem soro contendo o inibidor + hidróxido de cálcio. A expressão de CEMP-1 e CAP foi avaliada por Western blotting, 12 horas após o estímulo. **(B)** Experimentos tempo-dependentes mostram os efeitos do tratamento com hidróxido de cálcio na fosforilação de ERK-1 / ERK-2 (44 e 42 kDa). **(C)** Os efeitos da inibição de ERK-1 / ERK-2 por silenciadores de RNA (siRNA) na expressão de CAP e CEMP-1, estimuladas pelo hidróxido de cálcio, foram investigados com o objetivo de confirmar os resultados obtidos com o inibidor bioquímico de ERK. A eficácia do silenciamento de RNAm para ERK-1 / ERK-2 na expressão da proteína foi avaliado por meio de Western blotting. **(D)** Os efeitos da inibição de ERK na formação de nódulos de mineralização foram avaliados e o gráfico mostra o conteúdo de Vermelho de Alizarina em células do ligamento periodontal estimuladas com hidróxido de cálcio na presença ou não do inibidor bioquímico de ERK. Diferenças estatisticamente significantes estão indicadas por: a- comparado ao meio  $\alpha$ MEM contendo  $\beta$ G e AA com hidróxido de cálcio; b- comparado ao  $\alpha$ MEM contendo  $\beta$ G e AA; n = 3; p < 0,05 **(E)** Os efeitos de um medicamento bloqueador dos canais de cálcio (Methoxyverapamil Hydrochloride) na fosforilação de ERK-1 / ERK-2 foram avaliados 30 minutos após o tratamento com hidróxido de cálcio e / ou com o medicamento, enquanto que o efeito na expressão de CAP e CEMP-1 foram avaliados 12 horas após o estímulo.

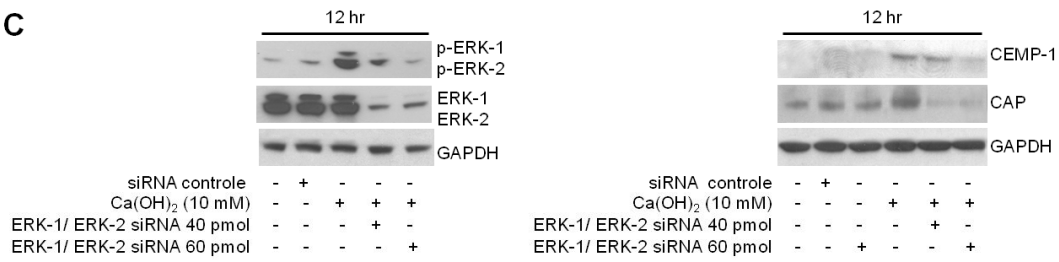
**A**



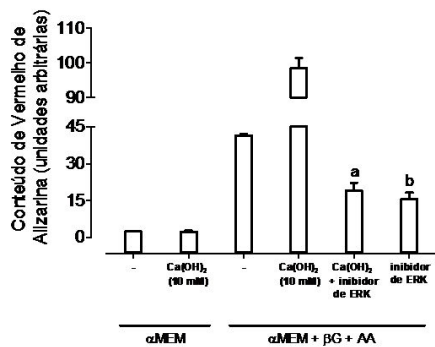
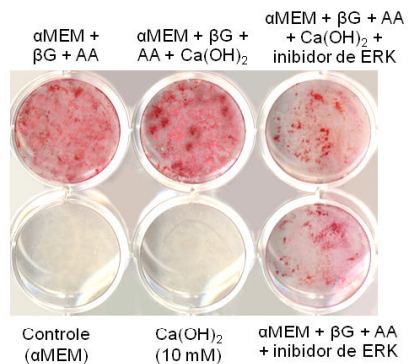
**B**



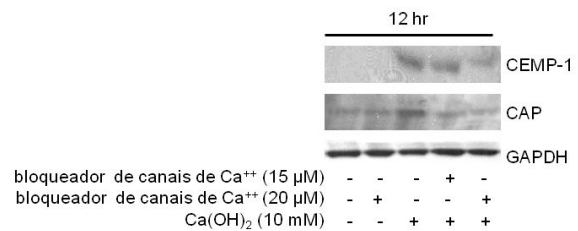
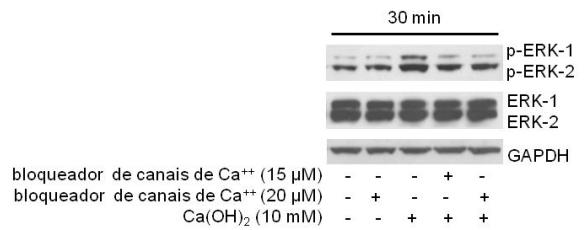
**C**



**D**



**E**



## DISCUSSÃO

A regeneração dos tecidos periodontais pós-tratamento endodôntico, em dentes com lesões periapicais, é um processo dificultado em função da variedade de tecidos que precisam ser formados para estabelecer as condições de normalidade na região periapical. Dentre estes tecidos está o cemento, uma estrutura importante que permite a ancoragem das fibras do ligamento periodontal ao elemento dental. Neste estudo foi demonstrado que o hidróxido de cálcio promove cementogênese por células do ligamento periodontal, as quais, após estimulação com o medicamento, passaram a expressar maior quantidade de CAP e CEMP-1, proteínas indicadoras de um fenótipo cementoblástico.

Nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única não houve formação de tecido mineralizado obliterando o forame apical e nos dentes com vitalidade pulpar submetidos ao tratamento endodôntico o processo de mineralização estava atrasado em relação aos espécimes nos quais foi utilizado o hidróxido de cálcio como curativo de demora (Capítulo 2), indicando, portanto, que o hidróxido de cálcio pode ser o mediador do processo de mineralização *in vivo*.

Neste estudo foi utilizado como curativo de demora uma pasta à base de hidróxido de cálcio em um veículo viscoso (Calen®), uma vez que é conhecido que o polietilenoglicol 400 permite a dissociação lenta dos íons cálcio e hidroxila, mantendo os efeitos benéficos desta dissociação por mais tempo na área desejada e, portanto, prolongando sua ação (Benatti-Neto, 1984; Silva, 1988; Leonardo, 2008). Os efeitos benéficos da dissociação lenta da pasta para uma resposta tecidual mais favorável foram demonstrados previamente (Silva, 1988; Leonardo *et al.*, 1993; Nelson-Filho *et al.*, 1999).

O ligamento periodontal é composto por células em diferentes estágios de diferenciação celular e comprometimento com linhagens celulares específicas, podendo dessa maneira, potencialmente contribuir para o processo de cementogênese, sob estímulos adequados. *In vitro*, as células do ligamento periodontal cultivadas em meio contendo ácido ascórbico e  $\beta$ -glicerofosfato são capazes de formar nódulos de mineralização e expressar RNAm para proteínas associadas à mineralização, dentre eles fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina, sialoproteína óssea e osteonectina (Liu *et al.*, 1997; Hayami *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2009). Neste estudo foi demonstrado, pela primeira vez, que o aumento na concentração extracelular de cálcio, após estimulação das células com hidróxido de cálcio, leva a diferenciação das células do ligamento periodontal em células com um

fenótipo cementoblástico e posterior mineralização *in vitro* e *in vivo*. A regulação da expressão de CAP e CEMP-1 e mineralização foram mediados por ERK-1 / ERK-2, proteínas quinases da família das proteínas quinases ativadoras de mitose. Após bloqueio dos canais de cálcio, por meio de um pan-inibidor de canais de cálcio, houve inibição da fosforilação de ERK-1 / ERK-2 e, portanto, da expressão de CAP e CEMP-1, indicando que a diferenciação cementoblástica e cementogêneses induzidos pelo hidróxido de cálcio é mediada via ERK MAPK. Ainda, nossos resultados contribuem para esclarecer o papel de CEMP-1 no recrutamento, proliferação e mineralização de células presentes no ligamento periodontal de humanos.

*In vivo*, as proteínas CEMP-1 e STRO-1 estavam co-localizadas em células adjacentes à superfície radicular, em áreas onde o neocemento havia sido depositado após o tratamento de canais radiculares, sugerindo que as células que depositaram o tecido mineralizado de reparação apresentavam origem mesenquimal. *In vitro*, a estimulação das células do ligamento periodontal com a proteína do cimento-1 recombinante humana estimulou a proliferação e migração celular, com a frente de migração composta por células positivas para o receptor de superfície STRO-1. Estes resultados corroboram com estudos prévios demonstrando que as células positivas para STRO-1 estão localizadas próximo ao cimento (Chen *et al.*, 2006). Embora a co-localização de células positivas para CEMP-1 e STRO-1 ainda não tenha sido descrita, nossos resultados sugerem uma possível relação entre essas duas moléculas na formação do cimento durante a reparação tecidual.

Durante o processo de reparo / regeneração dos tecidos apicais são necessários estímulos bioquímicos para a proliferação, migração, adesão e diferenciação celular de células indiferenciadas em um fenótipo cementoblástico. A proteína do cimento-1 pode ser um mediador destes processos, uma vez que, *in vitro*, CEMP-1 foi capaz de estimular a proliferação celular e migração de células mesenquimais STRO-1 positivas. O papel de CEMP-1 como um quimioatrativo e promotor de mineralização foi confirmado após o bloqueio da atividade da proteína, por meio de um anticorpo anti-CEMP-1, ocasionando migração celular atrasada e menor grau de mineralização se comparado às culturas estimuladas com a proteína isoladamente. Ainda, as células cementoblásticas CEMP-1 positivas observadas *in vitro* em contato direto com os nódulos de mineralização corroboram com o possível papel para CEMP-1 na regulação da cementogênese.

O papel da proteína do cimento-1 no processo de mineralização foi demonstrado

utilizando células expandidas a partir de cementoblastomas, nas quais após o bloqueio da atividade de CEMP-1 há menor atividade da enzima fosfatase alcalina e menor expressão de sialoproteína óssea e osteopontina, sem alterar a proliferação e viabilidade celulares (Álvarez-Pérez *et al.*, 2003). A transfecção do cDNA para CEMP-1 em fibroblastos gengivais, células que usualmente não expressam CEMP-1, levou ao desenvolvimento de um fenótipo cementoblástico nestas células. As células geneticamente modificadas passaram a expressar RNAm e proteínas para fosfatase alcalina, sialoproteína óssea, CAP, osteocalcina, osteopontina e *Runx2* / *Cbfa-1* e foram capazes de sintetizar nódulos de mineralização (Carmona-Rodríguez *et al.*, 2007; Villareal-Ramírez *et al.*, 2009).

Nossos resultados demonstraram que o aumento na concentração extracelular de cálcio estimulou a expressão de proteínas relacionadas à mineralização (CAP, CEMP-1, DMP-1 e sialoproteína óssea) e a utilização de um bloqueador inespecífico de canais de cálcio impediu a expressão das proteínas cementoblasto-específicas CEMP-1 e CAP. Estes resultados indicam que os íons cálcio são importantes para o processo de diferenciação celular, ainda que a modulação intracelular da concentração de cálcio e os possíveis os receptores envolvidos nestas condições sejam desconhecidos. Possíveis candidatos a mediadores do processo incluem canais de cálcio operados por ligantes, os receptores sensíveis ao cálcio extracelular (CaR), receptores glutamatérgicos ou receptores GABAérgicos (Breitwieser, 2008; Yamaguchi, 2008).

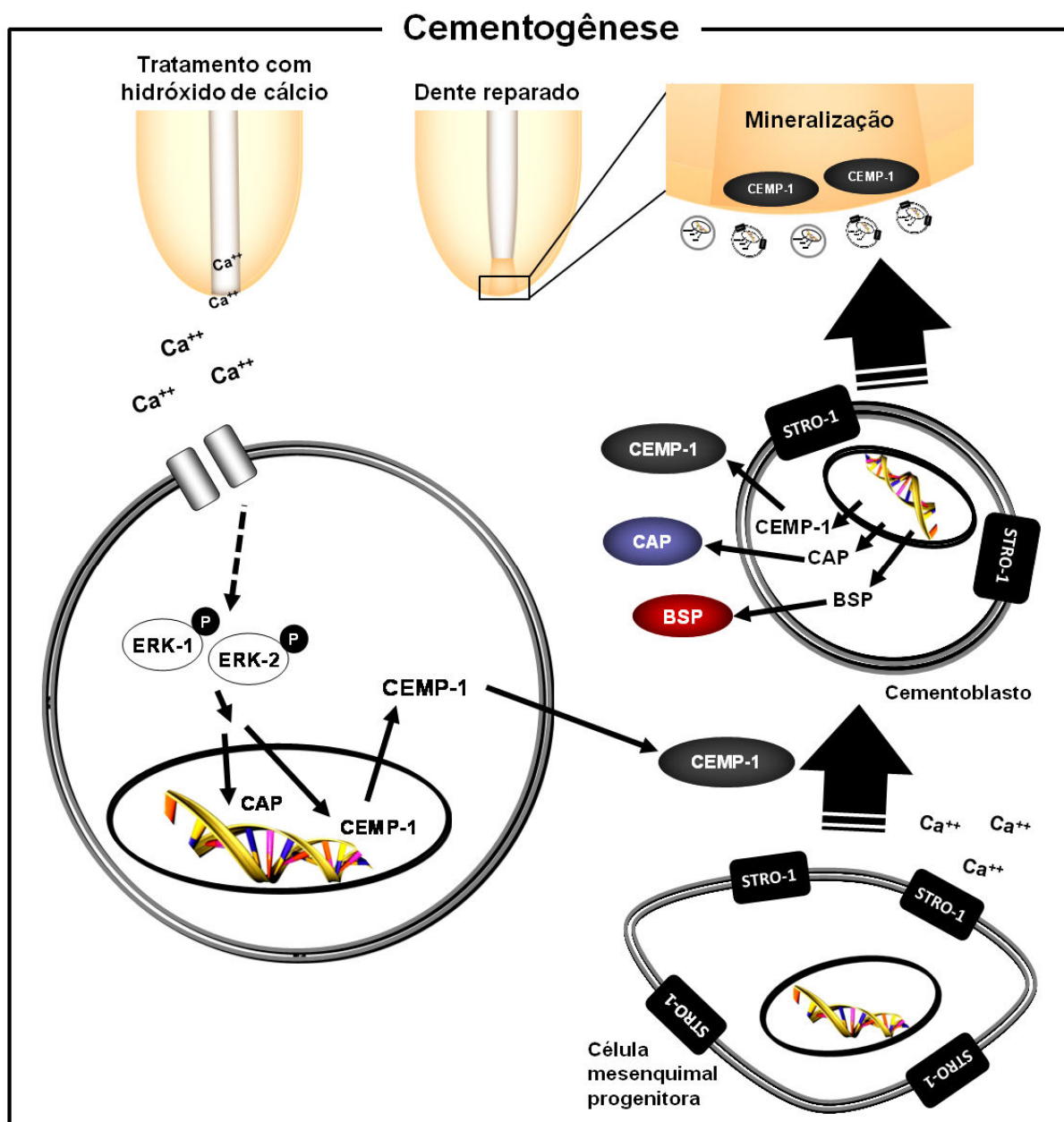
No meio intracelular, cálcio é um regulador conhecido da expressão gênica em osteoblastos, a qual é modulada via calmodulina e proteínas quinases cálcio-dependentes (Zayzafoon, 2006). Diversas respostas celulares à variação na concentração intracelular de cálcio tem sido relatada em osteoblastos, embora o papel dos íons cálcio na diferenciação de cementoblastos não seja conhecida. Em osteoblastos, o aumento na concentração intracelular de cálcio ativa a proteína calmodulina, a qual se liga e ativa a proteína quinase dependente de cálcio-calmodulina tipo II (CaMKII). CaMKII por sua vez é responsável pela fosforilação das proteínas quinases ativadoras de mitose reguladas por sinal extracelular ERK-1 e ERK-2, moléculas sinalizadoras intermediárias da expressão de genes específicos de osteoblastos via regulação do fator de transcrição *c-fos* (Zayzafoon *et al.*, 2005). O silenciamento do RNAm para ERK-1 e ERK-2 confirmou o papel desta via na diferenciação de células do ligamento periodontal em um fenótipo cementoblástico após tratamento com hidróxido de cálcio, corroborando com estudos prévios que demonstraram que a via de



sinalização ERK-1 e ERK-2 é ativada em resposta ao aumento da concentração extracelular de cálcio em células da linhagem osteoblástica 2T3, estimulando a expressão de RNAm para *Runx2*, osteopontina e osteocalcina (Yamaguchi *et al.*, 2000; Dvorak *et al.*, 2004).

Durante o processo de diferenciação celular, é importante que primeiramente ocorra o recrutamento de células mesenquimais indiferenciadas para a área de interesse. Os resultados deste trabalho fornecem evidências de que a proteína do cemento-1 poderia ser um mediador do processo de recrutamento e diferenciação de células do ligamento periodontal em cementoblastos, uma vez que CEMP-1 foi capaz de estimular a migração celular de células STRO-1 positivas e mineralização em culturas mantidas em meio contendo  $\beta$ -glicerofosfato e ácido ascórbico. A importância das células STRO-1 positivas no processo de reparação / regeneração periodontal advém de estudos prévios que demonstraram que células do ligamento periodontal STRO-1 positivas, inseridas em um arcabouço cerâmico de hidroxiapatita e fosfato tricálcico e a seguir transplantadas em defeitos periodontais artificialmente criados em ratos imunocomprometidos, foram capazes de depositar uma fina camada de cemento na superfície do arcabouço (Seo *et al.*, 2004). Células do ligamento periodontal de humanos, inseridas em um arcabouço cerâmico de hidroxiapatita e fosfato tricálcico e transplantadas no tecido subcutâneo de camundongos, também induziram a deposição de um tecido ósseo / cementóide na superfície do arcabouço e as células ao redor do tecido neoformado apresentaram expressão aumentada de RNAm para osteocalcina, sialoproteína óssea, CEMP-1 e *periostin*, diferentemente do grupo controle, nos quais foi implantado somente o arcabouço sem células (Fujii *et al.*, 2008).

Os resultados deste estudo corroboram e complementam estudos prévios, uma vez que nesta pesquisa foi demonstrada a presença de um tecido mineralizado semelhante ao cemento no ápice dental, em dentes submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora. Ao redor do tecido mineralizado, as células foram imunomarcadas positivamente para STRO-1 e CEMP-1, confirmando sua natureza mesenquimal e cementoblástica. Estes dados em conjunto com os estudos *in vitro* indicam que o tratamento com hidróxido de cálcio leva a expressão da proteína do cemento-1 por um mecanismo dependente de proteínas quinases ativadoras de mitose reguladas por sinal extracelular. Concomitantemente, a expressão de CEMP-1 modula o recrutamento de células mesenquimais STRO-1 positivas e medeia o processo de cementogênese. O modelo proposto para o processo de cementogênese mediada por CEMP-1 e ERK após estimulação com hidróxido de cálcio está demonstrado na Figura 3.7.



**Figura 3.7.** Modelo proposto para o processo de cementogênese mediada por CEMP-1 e ERK após estimulação com hidróxido de cálcio. A dissociação dos ions cálcio a partir do hidróxido de cálcio aplicado no interior dos canais radiculares leva ao aumento da concentração extracelular de cálcio e à expressão de *cementum attachment protein* (CAP) e proteína do cimento-1 (CEMP-1) via proteínas quinases ativadoras de mitose reguladas por sinal extracelular (ERK-1 / ERK-2). CEMP-1 está envolvida na migração de células mesenquimais progenitoras STRO-1 positivas e juntamente com o hidróxido de cálcio modula a migração, proliferação e diferenciação de células do ligamento periodontal em um fenótipo cementoblástico. As células diferenciadas secretam CEMP-1 a qual está envolvida na cementogênese e mineralização da matriz extracelular durante o reparo apical.

Neste estudo a neoformação do cemento foi avaliada *in vivo* em um modelo animal e a partir dos resultados obtidos foram investigados os mecanismos celulares e intracelulares envolvidos no processo. De acordo com os resultados obtidos nestas avaliações podemos concluir que:

- ✓ A diferenciação de células do ligamento periodontal em células com fenótipo semelhante ao do cementoblasto leva a deposição de tecido mineralizado *in vivo* no ápice do elemento dental.
- ✓ *In vitro*, células do ligamento periodontal de humanos estimuladas com hidróxido de cálcio expressam proteínas específicas de cementoblastos (CEMP-1 e CAP) e são capazes de sintetizar nódulos de mineralização. A diferenciação celular e mineralização são mediadas via proteínas quinases ativadoras de mitose reguladas por sinal extracelular (ERK).
- ✓ A ação do hidróxido de cálcio nas células do ligamento periodontal de humanos ocorre via canais de cálcio, uma vez que o bloqueio inespecífico destes canais inibiu a fosforilação de ERK-1 e ERK-2 e, portanto, a expressão de CEMP-1 e CAP.
- ✓ A proteína do cemento-1 está envolvida na migração, proliferação e mineralização de células do ligamento periodontal e parece ser central durante a diferenciação celular, uma vez que o bloqueio da atividade de CEMP-1 inibiu estes processos importantes para a cementogênese.

## CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste estudo pudemos concluir que:

- ✓ Utilizando-se a avaliação microscópica como padrão-ouro, observou-se que a tomografia computadorizada de feixe cônico permitiu a detecção de lesões periapicais com maior sensibilidade e acurácia do que a radiografia periapical convencional.
- ✓ Histologicamente, as lesões periapicais experimentais apresentaram bactérias distribuídas pelo sistema de canais radiculares e lacunas de reabsorção do cimento, além de estarem associadas à maior desorganização das fibras colágenas e expressão de metaloproteinases da matriz. A presença das metaloproteinases da matriz em processos inflamatórios periapicais de humanos (cistos e granulomas) foi demonstrada.
- ✓ Nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única, o desfecho do tratamento de canais radiculares foi caracterizado pela manutenção ou progressão da lesão periapical. Por outro lado, nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora, maior número de espécimes apresentaram diminuição da lesão periapical.
- ✓ A expressão de metaloproteinases da matriz foi modulada pelo tratamento endodôntico quando se utilizou o hidróxido de cálcio como curativo de demora, enquanto o tratamento endodôntico em sessão única permitiu alta expressão de metaloproteinases da matriz, similarmente aos dentes com lesão periapical não submetidos ao tratamento endodôntico.
- ✓ Nos dentes submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora, foi evidenciada neoformação de cimento na região do forame apical, diferentemente dos dentes submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única.
- ✓ Células do ligamento periodontal de humanos estimuladas com hidróxido de cálcio expressaram proteínas específicas de cementoblastos (CEMP-1 e CAP) e foram capazes de sintetizar nódulos de mineralização. A diferenciação celular e mineralização nestas células foram mediadas por proteínas quinases ativadoras de

- mitose reguladas por sinal extracelular (ERK).
- ✓ A ação do hidróxido de cálcio nas células do ligamento periodontal de humanos ocorreu via canais de cálcio, uma vez que o bloqueio inespecífico destes canais inibiu a fosforilação de ERK-1 e ERK-2 e, portanto, a expressão de CEMP-1 e CAP.
  - ✓ A proteína do cemento-1 estimulou a migração, proliferação e mineralização mediada por células do ligamento periodontal e parece ter um papel central na diferenciação e atividade celular, uma vez que o bloqueio de CEMP-1 inibiu estes processos importantes para a cementogênese.

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Ainda que os resultados obtidos no presente estudo venham a corroborar com estudos prévios demonstrando que o hidróxido de cálcio é um medicamento que induz a reparação apical e periapical pós-tratamento de canais radiculares, os resultados obtidos pela tomografia computadorizada indicam que ainda existe uma considerável persistência da lesão periapical refratária ao tratamento endodôntico.

Estes resultados podem ser vistos como uma necessidade de pesquisas que identifiquem os mediadores bioquímicos envolvidos no desenvolvimento, progressão e maturação das lesões periapicais. Este conhecimento fornecerá embasamento científico para o desenvolvimento de pesquisas futuras na busca por medicamentos associados ou não ao hidróxido de cálcio com o objetivo de permitir o reparo dos tecidos cementários e ósseo em tempo mais oportuno.

A investigação de vias sinalizadoras ativadas na inflamação periapical e, portanto, a descoberta de novos mediadores envolvidos na patologia periapical poderão determinar novas estratégias terapêuticas a serem implementadas na prática clínica visando a modulação farmacológica da inflamação em dentes portadores de lesões periapicais e um prognóstico mais favorável pós-tratamento de canais radiculares.

**REFERÊNCIAS\***

Agbaje JO, Jacobs R, Maes F, Michiels K, van Steenberghe D. Volumetric analysis of extraction sockets using cone beam computed tomography: a pilot study on ex vivo jaw bone. *J Clin Periodontol* 2007;34:985-990.

Aggarwal V, Logani A, Shah N. The evaluation of computed tomography scans and ultrasounds in the differential diagnosis of periapical lesions. *J Endod* 2008;34:1312-5.

Alvarez-Pérez MA, Pitaru S, Alvarez Fregoso O, Reyes Gasga J, Arzate H. Anti-cementoblastoma-derived protein antibody partially inhibits mineralization on a cementoblastic cell line. *J Struct Biol* 2003;143:1-13.

Álvarez-Pérez MA, Narayanan S, Zeichner-David M, Rodríguez-Carmona B, Arzate H. Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). *Bone* 2006;38:409-19.

Arzate H, Jiménez-García LF, Álvarez-Perez MA, Landa A, Bar-Kana I, Pitaru S. Immunolocalization of a human cementoblastoma-conditioned medium-derived protein. *J Dent Res* 2002;81:541-6.

Arzate H, Olson SW, Page RC, Gown AM, Narayanan AS. Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum. *FASEB J* 1992;11:2990-5.

Balto K, White R, Mueller R, Stashenko P. A mouse model of inflammatory root resorption induced by pulpal infection *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;93:461-8.

BarKana I, Narayanan AS, Grosskop A, Savion N, Pitaru S. Cementum attachment protein enriches putative cementoblastic populations on root surfaces in vitro. *J Dent Res* 2000;79:1482-8.

Barthel CR, Zimmer S, Trope M. Relationship of radiologic and histologic signs of inflammation in human root-filled teeth. *J Endod* 2004;30:75-9.

---

\* Normas internas do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da FORP-USP (2009), de acordo com o International Committee of Medical Journals Editors. Uniform Requirements for manuscripts submitted to Medical Journal, 1997. Disponível em: <http://www.mja.com.au/public/information/uniform.html>. Acesso em 16 de setembro de 2009.

Belmar MJ, Pabst C, Martínez B, Hernández M. Gelatinolytic activity in gingival crevicular fluid from teeth with periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:801-6.

Benatti-Neto C. Tratamento de perfurações radiculares com pasta de hidróxido de cálcio e iodofórmio - emprego de diferentes veículos. Estudo histológico em dentes de cães. Tese (Doutorado em Diagnóstico Oral): Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo; 1984.

Bender IB, Seltzer S. Roentgenographic and direct observation of experimental lesions in bone: I. *J Am Dent Assoc* 1961;62:152-60.

Bender IB. Factors influencing the radiographic appearance of bone lesions. *J Endod* 1982;8:161-70.

Bergenholtz G, Spångberg L. Controversies in endodontics. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15:99-114.

Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, *et al.* Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:197-250.

Bonner RF, Emmert-Buck M, Cole K, Pohida T, Chuaqui R, Goldstein S, *et al.* Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. *Science* 1997;278:1481-3.

Bosshardt DD. Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? *J Dent Res* 2005;84:390-406.

Breitwieser GE. Extracellular calcium as an integrator of tissue function. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:1467-80.

Brenner DJ, Hall EJ. Computed tomography: an increasing source of radiation exposure. *N Eng J Med* 2007;357:2277-84.

Brynolf I. A histological and roentgenological study of periapical region of human upper incisors. *Odontol Revy* 1967;18:1-97.

Bueno MR, Estrela C. Prevalência de prevalência de tratamento endodôntico e periodontite apical em várias populações do mundo, detectada por radiografias panorâmicas, periapicais e tomografias computadorizadas cone beam. *Robrac* 2008;17:79-90.

Carmona-Rodríguez B, Álvarez-Pérez MA, Narayanan S, Zeichner-David M, Reyes-Gasga J, Molina-Guarneroz, *et al.* Human cementum protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts. *Biochemical Biophysical Res Communications* 2007;358:763-9.

Carneiro E, Menezes R, Garlet GP, Garcia RB, Bramante CM, Figueira R, *et al.* Expression analysis of matrix metalloproteinase-9 in epithelialized and nonepithelialized apical periodontitis lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107:127-32.

Carrotte P. Endodontics: Part 1. The modern concept of root canal treatment. *Br Dent J* 2004a;197:181-3.

Carrotte P. Endodontics: Part 7. Preparing the root canal. *Br Dent J* 2004b;197:603-13.

Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 2003;253:269-285.

Chang YC, Yang SF, Lai CC, Liu JY, Hsieh YS. Regulation of matrix metalloproteinase production by cytokines, pharmacological agents and periodontal pathogens in human periodontal ligament fibroblast cultures. *J Periodontal Res* 2002;37:196-203.

Chen SC, Marino V, Gronthos S, Bartold PM. Location of putative stem cells in human periodontal ligament. *J Periodont Res* 2006;41:547-53.

Cheung GS. Survival of first-time nonsurgical root canal treatment performed in a dental teaching hospital. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;93:596-604.

Chuderland D, Marmor G, Shainskaya A, Seger R. Calcium-mediated interactions regulate the subcellular localization of extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem* 2008;283:11176-88.

Chugal NM, Clive JM, Spångberg LS. Endodontic infection: some biologic and treatment factors associated with outcome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;96:81-90.

Consolaro A. Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas. Dental Press International: Maringá; 2005.



Cordeiro RCL, Leonardo MR, Silva LAB, Cerri PS. Desenvolvimento de um dispositivo para padronização de tomadas radiográficas em cães. *RPG* 1995;2:138-40.

Corotti MV, Zambuzzi WF, Paiva KB, Menezes R, Pinto LC, Lara VS, *et al.* Immunolocalization of matrix metalloproteinases-2 and -9 during apical periodontitis development. *Arch Oral Biol* 2009;54:764-71.

Cotti E, Campisi G, Ambu R, Dettori C. Ultrasound real-time imaging in the differential diagnosis of periapical lesions. *Int Endod J* 2003;36:556-63.

Cotti E, Vargiu P, Dettori C, Mallarini G. Computadorized tomography in the management and follow-up of extensive periapical lesion. *Endod Dent Traumatol* 1999;15:186-9.

Cotton TP, Geisler TM, Holden DT, Schwartz SA, Schindler WG. Endodontic applications of cone-beam volumetric tomography. *J Endod* 2007;33:1121-32.

Delzangles B, Boy-Lefevre ML, Forest N. Glycoproteins expression in apical pathologic tissues: clinical incidences. *J Endod* 1997;23:565-8.

De-Rossi A, Rocha LB, Rossi MA. Application of fluorescence microscopy on hematoxylin and eosin-stained sections of healthy and diseased teeth and supporting structures. *J Oral Pathol Med* 2007;36:377-81.

De-Rossi A, Rocha LB, Rossi MA. Interferon-gamma, interleukin-10, intercellular adhesion molecule-1, and chemokine receptor 5, but not interleukin-4, attenuate the development of periapical lesions. *J Endod* 2008;34:31-8.

De-Rossi A, Silva LAB, Leonardo MR, Rocha LB, Rossi MA. Effect of rotary or manual instrumentation, with or without a calcium hydroxide / 1% chlorhexidine intracanal dressing, on the healing of experimentally induced chronic periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99:628-36.

Dvorak MM, Siddiqua A, Ward DT, Carter DH, Dallas SL, Nemeth EF, *et al.* Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:5140-5.

Eberhard J, Plagmann HC. Changes in the periodontal membrane due to apical periodontitis. *J Endod* 1999;25:486-9.

Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, *et al.* Laser capture microdissection. *Science* 1996;274:998-1001.

Eriksen HM. Endodontology: epidemiologic considerations. *Endod Dent Traumatol* 1991;7:189-95.

Estrela C, Bueno MR, Azevedo BC, Azevedo JR, Pecora JD. A new periapical index based on cone beam computed tomography. *J Endod* 2008a;34:1325-31.

Estrela C, Bueno MR, Leles CR, Azevedo B, Azevedo JR. Accuracy of cone beam computed tomography and panoramic and periapical radiography for detection of apical periodontitis. *J Endod* 2008b;34:273-9.

Estrela C, Leles CR, Hollanda AC, Moura MS, Pécora JD. Prevalence and risk factors of apical periodontitis in endodontically treated teeth in a selected population of Brazilian adults. *Braz Dent J* 2008c;19:34-9.

European Society of Endodontology. Quality guidelines for endodontic treatment: consensus report of the European Society of Endodontology. *Int Endod J* 2006;39:921-30.

Fabricius L, Dahlén G, Sundqvist G, Happonen RP, Möller AJ. Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of experimentally infected monkey teeth. *Eur J Oral Sci* 2006;114:278-85.

Fava LR, Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *Int Endod J* 1999;32:257-82.

Figdor D. Apical periodontitis: a very prevalent problem. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94:651-2.

Figini L, Lodi G, Gorni F, Gagliani M. Single versus multiple visits for endodontic treatment of permanent teeth. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;17:CD005296.

Foster BL, Sommerman MJ. Regenerating the periodontium: is there a magic formula? *Orthod Craniofacial Res* 2005;8:285-91.

Frederiks WM, Mook ORF. Metabolic mapping of proteinase activity with emphasis on in situ zymography of gelatinases: review and protocols. *J Histochem Cytochem* 2004;52:711-22.

Fristad I, Molven O, Halse A. Nonsurgically retreated root filled teeth-radiographic findings after 20-27 years. *Int Endod J* 2004;37:12-8.

Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *J Biol Chem* 2001;276:41279-87.

Fujii S, Maeda H, Wada N, Tomokiyo A, Saito M, Akamine A. Investigating a clonal human periodontal ligament progenitor / stem cell line in vitro and in vivo. *J Cell Physiol* 2008;215:743-9.

García CC, Sempere FV, Diago MP, Bowen EM. The post-endodontic periapical lesion: histologic and etiopathogenic aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007;12:e585-90.

Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, *et al.* Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21:12-20.

Gay IC, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofacial Res* 2007;10:149-60.

Gesi A, Hakeberg M, Warfvinge J, Bergenholtz G. Incidence of periapical lesions and clinical symptoms after pulpectomy: a clinical and radiographic evaluation of 1- versus 2-session treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:379-88.

Gibbs SJ. Effective dose equivalent and effective dose: comparison for common projections in oral and maxillofacial radiology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;90:538-45.

Gielkens PF, Schortinghuis J, Jong JR, Huysmans MC, Leeuwen MB, Raghoobar GM, *et al.* A comparison of micro-CT, microradiography and histomorphometry in bone research. *Arch Oral Biol* 2008;53:558-66.

Gonçalves PF, Sallum EA, Casati MZ, Toledo S, Nociti-Jr FH. Dental cementum reviewed: development, structure, composition, regeneration and potential functions. *Braz J Oral Sci* 2005;4:651-8.

Grecca FS, Leonardo MR, Silva LAB, Tanomaru Filho M, Borges MAG. Radiographic evaluation of periradicular repair after endodontic treatment of dog's teeth with induced periradicular periodontitis. *J Endod* 2001;27:610-2.

Grecca FS. Avaliação radiográfica da reparação apical e periapical pós-tratamento de canais radiculares de dentes de cães, com lesão periapical crônica induzida, utilizando-se dois diferentes curativos de demora à base de hidróxido de cálcio e dois cimentos obturadores. Tese (Doutorado em Endodontia): Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 1999.

Green TL, Walton RE, Taylor JK, Merrel P. Radiographic and histologic periapical findings of root canal treated teeth in cadaver. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997;83:707-11.

Grzesik WJ, Narayanan AS. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13:474-84.

Gusman H, Santana RB, Zehnder M. Matrix metalloproteinase levels and gelatinolytic activity in clinically healthy and inflamed human dental pulps. *Eur J Oral Sci* 2002;110:353-7.

Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontologica Scandinavica* 2007; 65:1-13.

Hassan B, Metska ME, Ozok AR, van der Stelt P, Wesselink PR. Detection of vertical root fractures in endodontically treated teeth by a cone beam computed tomography scan. *J Endod* 2009;35:719-22.

Hayakawa T. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in development and disease of oral tissues. *Dent Japan* 1998;34:167-77.

Hayami T, Zhang Q, Kapila Y, Kapila S. Dexamethasone's enhancement of osteoblastic markers in human periodontal ligament cells is associated with inhibition of collagenase expression. *Bone* 2007;40:93-104.

Hernandez M, Valenzuela MA, Lopez-Otin C, Alvarez J, Lopez JM, Vernal R, Gamonal J. Matrix metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity. *J Periodontol* 2006;77:1863-70.

Holland R, Otoboni-Filho JA, Souza V, Nery MJ, Bernabé PF, Dezan E Jr. A comparison of one versus two appointment endodontic therapy in dogs' teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2003;29:121-4.

Hollanda AC, Alencar AH, Estrela CR, Bueno MR, Estrela C. Prevalence of endodontically treated teeth in a Brazilian adult population. *Braz Dent J* 2008;19:313-7.

Hong CY, Lin SK, Kok SH, Cheng SJ, Lee MS, Wang TM, Chen CS, Lin LD, Wang JS. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med* 2004;33:162-169.

Huumonen S, Kvist T, Gröndahl K, Molander A. Diagnostic value of computed tomography in re-treatment of root fillings in maxillary molars. *Int Endod J* 2006;39:827-33.

Huumonen S, Ørstavik D. Radiological aspects of apical periodontitis. *Endod Topic* 2002;1:3-25.

International Organization for Standardization (ISO). ISO 7405: Dentistry – Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry – Test methods for dental materials. Switzerland; 1997.

Jo Y-Y, Lee H-J, Kook S-Y, Choung H-W, Park J-Y, Chung J-H, *et al.* Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng* 2007;13:767-73.

JOE Editorial Board. Uses of calcium hydroxide: an online study guide. *J Endod* 2008;34:e87-92.

Jorge EG, Tanomaru-Filho M, Gonçalves M, Tanomaru JMG. Detection of periapical lesion development by conventional radiography or computed tomography. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106:e56-e61.

Kabak SL, Kabak YS, Anischenko SL. Light microscopic study of periapical lesions associated with asymptomatic apical periodontitis. *Ann Anat* 2005;187:185-94.

Kajiya M, Shiba H, Fujita T, Ouhara K, Takeda K, Mizuno N, *et al.* Brain-derived neurotrophic factor stimulates bone / cementum-related protein gene expression in cementoblasts. *J Biol Chem* 2008;283:16259-67.

Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20:340-9.

Kaneko JJ. *Clinical biochemistry of domestic animals*. San Diego: Academic Press; 1989.

Kapila YL, Kapila S, Johnson PW. Fibronectin and fibronectin fragments modulate the expression of proteinases and proteinase inhibitors in human periodontal ligament cells. *Matrix Biol* 1996;15:251-61.

Kapila YL, Niu J, Johnson PW. The high affinity heparin-binding domain and the V region of fibronectin mediate invasion of human oral squamous cell carcinoma cells in vitro. *J Biol Chem* 1997;272:18932-8.

Kassebaum DK, Reaedr CM, Kleier DJ, Averbach RE. Localization of anatomic structures before endodontic surgery with tomograms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991;72:610-3.

Katebzadeh N, Hupp J, Trope M. Histological periapical repair after obturation of infected root canals in dogs. *J Endod* 1999;25:364-8.

Katebzadeh N, Sigurdsson A, Trope M. Radiographic evaluation of periapical healing after obturation of infected root canals: an in vivo study. *Int Endod J* 2000;33:60-6.

Kawahara T, Murakami S, Noiri Y, Ehara A, Takemura N, Furukawa S, Ebisu S. Effects of cyclosporin-A-induced immunosuppression on periapical lesions in rats. *J Dent Res* 2004;83:683-7.

Kawashima N, Stashenko P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Arch Oral Biol* 1999;44:55-66.

Kémoun P, Laurencin-Dalícieux S, Rue J, Farges J-C, Gennero I, Conte-Auriol F, *et al.* Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/ -7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell Tissue Res* 2007a;329:283-94.

Kémoun P, Laurencin-Dalícieux S, Rue J, Vaysse F, Roméas A, Arzate H, *et al.* Localization of STRO-1, BMP-2 / -3 / -7, BMP receptors and phosphorylated Smad-1 during the formation of mouse periodontium. *Tissue Cell* 2007b;39:257-66.

Kirkevang LL, Vaeth M, Hörsted-Bindslev P, Bahrami G, Wenzel A. Risk factors for developing apical periodontitis in a general population. *Int Endod J* 2007;40:290-9.

Kitagawa M, Tahara H, Kitagawa S, Oka H, Kudo Y, Sato S, *et al.* Characterization of established cementoblast-like cell lines from human cementum-lining cells in vitro and in vivo. *Bone* 2006;39:1035-42.

Kojima K, Inamoto K, Nagamatsu K, Hara A, Nakata K, Morita I, *et al.* Success rate of endodontic treatment of teeth with vital and nonvital pulps. A meta-analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:95-9.

Krane SM. Clinical Importance of metalloproteinases and their inhibitors. *Ann N Y Acad Sci* 1994;732:1-10.

Lascalea CA, Panella J, Marques MM. Analysis of the accuracy of linear measurements obtained by cone beam computed tomography (CBCT-NewTom). *Dentomaxillofacial Radiol* 2004;33:291-4.

Laux M, Abbott PV, Pajarola G, Nair PNR. Apical inflammatory root resorption: a correlative radiographic and histological assessment. *Int Endod J* 2000;33:483-93.

Lee YL, Liu J, Clarkson BH, Lin CP, Godovikova V, Ritchie HH. Dentin-pulp complex responses to carious lesions. *Caries Res* 2006;40:256-64.

Leeman MF, Curran S, Murray GI. The structure, regulation, and function of human matrix metalloproteinase-13. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2002;37:149-166.

Leonardi R, Caltabiano R, Loreto C. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed in periapical lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J* 2005;38:297-301.

Leonardo MR, Almeida WA, Ito IY, Silva LAB. Radiographic and microbiologic evaluation of posttreatment apical and periapical repair of root canals of dogs' teeth with experimentally induced chronic lesion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;78:232-8.

Leonardo MR, Barnett F, Debelian GJ, Pontes-Lima RK, Silva LAB. Root canal adhesive filling in dogs' teeth with or without coronal restoration: a histopathological evaluation. *J Endod* 2007;33:1299-303.

Leonardo MR, Hernandez ME, Silva LA, Tanomaru-Filho M. Effect of a calcium hydroxide-based root canal dressing on periapical repair in dogs: a histological study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:680-5.

Leonardo MR, Leal JM. Obtenção dos canais radiculares: técnicas convencionais. In: Leonardo MR. *Endodontia: tratamento de canais radiculares. Princípios técnicos e biológicos*. São Paulo: Artes Médicas; 2008. p.1127-45.

Leonardo MR, Rossi MA, Silva LAB, Ito IY, Bonifácio KC. EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. *J Endod* 2002;28:815-8.

Leonardo MR, Silva LAB, Leonardo RT, Utrilla LS, Assed S. Histological evaluation of therapy using a calcium hydroxide dressing for teeth with incompletely formed apices and periapical lesions. *J Endod* 1993a;19:348-52.

Leonardo MR, Silva LAB, Utrilla LS, Leonardo RT, Consolaro A. Effect of intracanal dressings on repair and apical bridging of teeth with incomplete root formation. *Endod Dent Traumatol* 1993b;9:25-30.

Leonardo MR. *Endodontia: tratamento de canais radiculares. Princípios técnicos e biológicos*. São Paulo: Artes Médicas; 2008.

Liapatas S, Nakou M, Rontogianni D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J* 2003;36:464-471.

Liedke GS, Silveira HED, Silveira HLD, Dutra V, Figueiredo JAP. Influence of voxel size in the diagnostic ability of cone beam tomography to evaluate simulated external root resorption. *J Endod* 2009;35:233-5.

Lin LM, Huang GTJ, Rosenberg PA. Proliferation of epithelial cell rests, formation of apical cysts, and regression of apical cysts after periapical wound healing. *J Endod* 2007;33:908-16.

Lin LM, Ricucci D, Lin J, Rosenberg PA. Nonsurgical root canal therapy of large cyst-like inflammatory periapical lesions and inflammatory apical cysts. *J Endod* 2009;35:607-15.



Lin N-H, Menicanin D, Mrozik K, Gronthos S, Bartold PM. Putative stem cells in regenerating human periodontium. *J Periodontol Res* 2008;43:514-23.

Lin SK, Chiang CP, Hong CY, Lin CP, Lan WH, Hsieh CC, *et al.* Immunolocalization of interstitial collagenase (MMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in radicular cysts. *J Oral Pathol Med* 1997;26:458-63.

Lin SK, Kok SH, Kuo MY, Lee MS, Wang CC, Lan WH, Hsiao M, *et al.* Nitric oxide promotes infectious bone resorption by enhancing cytokine-stimulated interstitial collagenase synthesis in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2003;18:39-46.

Lin SK, Kok SH, Kuo MYP, Wang TJ, Wang JT, Yeh FTC, *et al.* Sequential expressions of MMP-1, TIMP-1, IL-6 and COX-2 genes in induced periapical lesions in rats. *Eur J Oral Sci* 2002;110:246-253.

Liu HW, Yacobi R, Savion N, Narayanan AS, Pitaru S. A collagenous cementum-derived attachment protein is a marker for progenitor of the mineralized tissue-forming cell lineage of the periodontal ligament. *J Bone Mineral Res* 1997;12:1691-9.

Lofthag-Hansen S, Huuonen S, Gröndahl K, Gröndahl HG. Limited cone beam CT and intraoral radiography for the diagnosis of periapical pathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:114-9.

Lombard C, Saulnier J, Wallach J. Assays of matrix metalloproteinases (MMPs) activities: a review. *Biochimie* 2005;87:265-72.

Loubele M, Jacobs R, Maes F, Denis K, White S, Coudyzer W, *et al.* Image quality vs radiation dose of four cone beam computed tomography scanners. *Dentomaxillofac Radiol* 2008;37:309-19.

Lu H, Jin D, Kapila YL. Application of laser capture microdissection to phage display peptide library screening. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;98:692-7.

Mah JK, Danforth RA, Bumann A, Hatcher D. Radiation absorbed in maxillofacial imaging with a new dental computed tomography device. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;96:508-13.

Mahesh M. Search for isotropic resolution in CT from conventional through multiple-row detector. *Radiographics* 2002;22:949-62.

Martinez ZR, Naruishi K, Yamashiro K, Myokai F, Yamada T, Matsuura K, *et al.* Gene profiles during root canal treatment in experimental rat periapical lesions. *J Endod* 2007;33:936-43.

Martón IJ, Kiss C. Influence of surgical treatment of periapical lesions on serum and blood levels of inflammatory mediators. *Int Endod J* 1992;25:229-33.

Márton IJ, Kiss C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2000;15:139-50.

Matherne RP, Angelopoulos C, Kulild JC, Tira D. Use of cone-beam computed tomography to identify root canal systems in vitro. *J Endod* 2008;34:87-9.

Mead C, Javidan-Nejad S, Mego ME, Nash B, Torabinejad M. Levels of evidence for the outcome of endodontic surgery. *J Endod* 2005;31:19-24.

Metzger Z, Belkin D, Kariv N, Dotan M, Kfir A. Low-dose doxycycline inhibits bone resorption associated with apical periodontitis. *Int Endod J* 2008;41:303-309.

Morimoto T, Yamasaki M, Nakata K, Tsuji M, Nakamura H. The expression of macrophage and neutrophil elastases in rat periradicular lesions. *J Endod* 2008;34:1072-6.

Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Oda S, Muneta T, *et al.* Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *J Periodontol Res* 2006;41:303-10.

Nair MK, Nair UP. Digital and advanced imaging in endodontics: a review. *J Endod* 2007;33:1-6.

Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99:231-52.

Nair PN, Sjögren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod* 1990;16:580-8.

Nair PN, Sjögren U, Schumacher E, Sundqvist G. Radicular cyst affecting a root-filled human tooth: a long-term posttreatment follow-up. *Int Endod J* 1993;26:225-33.

Nair PN. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontol 2000* 1997;13:121-48.

Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15:348-81.

Nair PN, Pajarola G, Schroeder HE. Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;81:93-102.

Nair PN. New perspectives on radicular cysts: do they heal? *Int Endod J* 1998;31:155-60.

Naito T. Single or multiple visits for endodontic treatment? *Evid Based Dent* 2008;9:24.

Nakamura K, Yamasaki M, Nishigaki N, Iwama A, Imaizumi I, Nakamura H, *et al.* Effect of methotrexate-induced neutropenia on pulpal inflammation in rats. *J Endod* 2002;28:287-90.

Nakata K, Naitoh M, Izumi M, Inamoto K, Ariji E, Nakamura H. Effectiveness of dental computed tomography in diagnostic imaging of periradicular lesion of each root of a multirrooted tooth: a case report. *J Endod* 2006;32:583-7.

Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000* 2006;40:11-28.

Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva LAB, Assed S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. *J Endod* 2002;28:694-6.

Ng YL, Mann V, Rahbaran S, Lewsey J, Gulabivala K. Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature. Part 1: effects of study characteristics on probability of success. *Int Endod J* 2007;40:921-39.

Ng YL, Mann V, Rahbaran S, Lewsey J, Gulabivala K. Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature. Part 2: influence of clinical factors. *Int Endod J* 2008;41:6-31.

Nishikawa M, Yamaguchi Y, Yoshitake K, Saeki Y. Effects of TNF-alpha and prostaglandin E2 on the expression of MMPs in human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res* 2002;37:167-76.

Oliveira PT, Zalzal SF, Beloti MM, Rosa AL, Nanci A. Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. *J Biomed Mater Res A* 2007;80:554-64.

Ørstavik D, Kerekes K, Eriksen HM. Clinical performance of three endodontic sealers. *Endod Dent Traumatol* 1987;3:178-86.

Ørstavik D, Pitt-Ford TR. Apical periodontitis: microbial infection and host responses. In: Ørstavik D, Pitt-Ford TR, eds. *Essential Endodontology*. Oxford: Blackwell Science; 1998; p. 1-8.

Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:221-33.

Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2004;4:617-29.

Patel S, Dawood A, Pitt-Ford T, Whaites E. The potential applications of cone beam computed tomography in the management of endodontic problems. *Int Endod J* 2007;40:818-30.

Patel S, Dawood A, Wilson R, Horner K, Mannocci F. The detection and management of root resorption lesions using intraoral radiography and cone beam computed tomography: an in vivo investigation. *Int Endod J* 2009;42:831-8.

Patel S, Horner K. The use of cone beam computed tomography in endodontics. *Int Endod J* 2009;42:755-6.

Patel S. New dimensions in endodontic imaging. Part 2: Cone beam computed tomography. *Int Endod J* 2009;42:463-75.

Paula-Silva FWG, Ghosh A, Silva LAB, Kapila YL. TNF- $\alpha$  induces an odontoblastic phenotype in dental pulp cells. *J Dent Research* 2009;88:339-44.

Peters LB, Wesselink PR. Periapical healing of endodontically treated teeth in one and two visits obturated in the presence or absence of detectable microorganisms. *Int Endod J* 2002;35:660-7.

Rhodes JS, Pitt-Ford TR, Lynch JA, Liepins PJ, Curtis RV. Micro-computed tomography: a new tool for experimental endodontology. *Int Endod J* 1999;32:165-70.

Ricucci D, Bergenholtz G. Bacterial status in root-filled teeth exposed to the oral environment by loss of restoration and fracture or caries: a histobacteriological study of treated cases. *Int Endod J* 2003;36:787-802.

Ricucci D, Langeland K. Apical limit of root canal instrumentation and obturation. Part 2: a histological study. *Int Endod J* 1998;31:394-409.

Ricucci D, Lin LM, Spångberg LS. Wound healing of apical tissues after root canal therapy: a long-term clinical, radiographic, and histopathologic observation study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009. *In press*.

Ricucci D, Mannocci F, Pitt Ford TR. A study of periapical lesions correlating the presence of a radiopaque lamina with histological findings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:389-94.

Rocha CT, Rossi MA, Leonardo MR, Rocha LB, Nelson-Filho P, Silva LA. Biofilm on the apical region of roots in primary teeth with vital and necrotic pulps with or without radiographically evident apical pathosis. *Int Endod J* 2008;41:664-9.

Rossa-Junior C, Liu M, Patil C, Kirkwood KL. MKK3/6-p38 MAPK negatively regulates murine MMP-13 gene expression induced by IL-1beta and TNF-alpha in immortalized periodontal ligament fibroblasts. *Matrix Biol* 2005;24:478-88.

Rowe AHR, Binnie WH. Correlation between radiological and histological changes following root canal treatment. *J Br Endod Soc* 1974;7:57-63.

Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J Endod* 1993;19:76-8.

Saito M, Iwase M, Maslan S, Nozaki N, Yamauchi M, Handa K, *et al*. Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. *Bone* 2001;29:242-8.

Sathorn C, Parashos P, Messer HH. Effectiveness of single- versus multiple-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J* 2005;38:347-55.

Saygin NE, Giannobile WV, Sommerman MJ. Molecular and cell biology of cementum. *Periodontol* 2000 2000;24:73-98.

Scarfe WC, Farman AG, Sukovic P. Clinical applications of cone-beam computed tomography in dental practice. *J Can Dent Ass* 2006;72:75-80.

Schulz M, von Arx T, Altermatt HJ, Bosshardt D. Histology of periapical lesions obtained during apical surgery. *J Endod* 2009;35:634-42.

Schulze D, Blessmann M, Pohlenz P, Wagner KW, Heiland M. Diagnostic criteria for the detection of mandibular osteomyelitis using cone-beam computed tomography. *Dentomaxillofac Radiol* 2006;35:232-5.

Schwarz MS, Rothman SLG, Rhodes ML, Chafetz N. Computed tomography. Part 1: preoperative assessment of the mandible for endosseous implant surgery. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1987;2:137-41.

Seo B-M, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, *et al.* Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004;364:149-55.

Shao Y, Wang L, Hicks DG, Ballock RT. Analysis of gene expression in mineralized skeletal tissues by laser capture microdissection and RT-PCR. *Lab Invest* 2006;86:1089-95.

Shin SJ, Lee J, Baek SH, Lin SS. Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. *J Endod* 2002;28:313-315.

Silva LAB, da Silva RA, Branco LG, Navarro VP, Nelson-Filho P. Quantitative radiographic evaluation of periapical bone resorption in dog's teeth contaminated with bacterial endotoxin (LPS) associated or not with calcium hydroxide. *Braz Dent J* 2008a;19:296-300.

Silva LAB, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo. *J Endod* 2002;28:94-8.

Silva LAB, Silva FWGP, Leonardo MR, Assed S. Radiographic evaluation of pulpal and periapical response of dogs' teeth after pulpotomy and use of recombinant human bone morphogenetic protein-7 as a capping agent. *J Dent Child* 2008b;75:15-9.

Silva LAB. Rizogênese incompleta: efeito de diferentes pastas à base de hidróxido de cálcio na complementação radicular e na reparação periapical em dentes de cães. Estudo histológico. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas): Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 1987.

Silva LAB. Rizogênese incompleta - efeito dos curativos de demora" e "expectante", no tratamento de canais radiculares de dentes de cães com reação periapical crônica. Avaliação radiográfica e histopatológica. Tese (Doutorado em Ciências Odontológicas): Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 1991.

Silveira AM, Lopes HP, Siqueira JF Jr, Macedo SB, Consolaro A. Periradicular repair after two-visit endodontic treatment using two different intracanal medications compared to single-visit endodontic treatment. *Braz Dent J* 2007;18:299-304.

Silveira HL, Silveira HE, Liedke GS, Lermen CA, Dos Santos RB, de Figueiredo JA. Diagnostic ability of computed tomography to evaluate external root resorption in vitro. *Dentomaxillofac Radiol* 2007;36:393-6.

Simon JHS, Enciso E, Malfaz JM, Roges R, Bailey-Perry M, Patel A. Differential diagnosis of large periapical lesions using cone-beam computed tomography measurements and biopsy. *J Endod* 2006;32:833-7.

Siqueira Jr JF, Lopes HP Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J* 1999;32:361-9.

Siqueira Jr JF. Strategies to treat infected root canals. *J Calif Dent Assoc* 2001;29:825-837.

Sjögren U, Figdor D, Spångberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J* 1991;24:119-25.

Sloan AJ, Smith AJ. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Dis* 2007;13:151-7.

Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Bègue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H. Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol* 1995;39:273-80.

Smith AJ. Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. *J Dent Educ* 2003;67:678-89.

Snoek-van Beurden PAM, Von den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *BioTechniques* 2005;38:73-83.

Sorsa T, Tjaderhane L, Konttinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM, *et al.* Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med* 2006;38:306-21.

Souza-Gugelmin MCM, Lima SNM, Lima CDL, Jacobovitz M, Ito IY. Biossegurança: controle de infecção na Odontologia. In: Leonardo MR. *Endodontia: tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos*. São Paulo: Artes Médicas; 2005. p. 365-406.

Spångberg L. Endodontics in the era of evidence-based practice. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;96:517-8.

Stabholz A, Friedman S, Tamse A. Endodontic failures and re-treatment. In: Cohen S, Burns RC, eds. *Pathways of the pulp*. St Louis: Mosby; 1994; p. 692-723.

Stanley HR, Pameijer CH. Dentistry's friend: calcium hydroxide. *Oper Dent* 1997;22:1-3.

Stashenko P, Yu SM. T helper and T suppressor cell reversal during the development of induced rat periapical lesions. *J Dent Res* 1989;65:830-4.

Stavropoulos A, Wenzel A. Accuracy of cone beam dental CT, intraoral digital and conventional film radiography for the detection of periapical lesion. An ex vivo study in pig jaws. *Clin Oral Invest* 2007;11:101-6.

Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:463-516.



Tachibana H, Matsumoto K. Applicability of X-ray computerized tomography in endodontics. *Endod Dent Traumatol* 1990;6:16-20.

Takagi H, Shibutani M, Kato N, Fujita H, Lee KY, Takigami S, Mitsumori K, Hirose M. Microdissected region-specific gene expression analysis with methacarn-fixed, paraffin-embedded tissues by real-time RT-PCR. *J Histochem Cytochem* 2004;52:903-13.

Takahashi K, MacDonald D, Murayama Y, Kinane D. Cell synthesis, proliferation and apoptosis in human dental periapical lesions analysed by in situ hybridisation and immunohistochemistry. *Oral Dis* 1999;5:313-20.

Tammisalo T, Luostarinen T, Vähätalo K, Neva M. Detailed tomography of periapical and periodontal lesions. Diagnostic accuracy compared with periapical radiography. *Dentomaxillofac Radiol* 1996;25:89-96.

Tanomaru JMG, Leonardo MR, Silva LA, Polisele-Neto A, Tanomaru-Filho M. Histopathological evaluation of different methods of experimental induction of periapical periodontitis. *Braz Dent J* 2008;19:238-44.

Tanomaru JMG. Métodos de indução experimental de lesão periapical em dentes de cães. Análise histopatológica e histomicrobiológica. Tese (Doutorado em Endodontia): Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2004.

Teronen O, Salo T, Konttinen YT, Rifkin B, Vernillo A, Ramamurthy NS, *et al.* Identification and characterization of gelatinase/ type IV collagenase in jaw cysts. *J Oral Pathol Med* 1995a;24:78-84.

Teronen O, Salo T, Laitinen J, Törnwall J, Ylipaavalniemi P, Konttinen YT, *et al.* Characterization of interstitial collagenases in jaw cyst wall. *Eur J Oral Sci* 1995b;103:141-7.

Tjäderhane L, Hotakainen T, Kinnunen S, Ahonen M, Salo T. The effect of chemical inhibition of matrix metalloproteinases on the size of experimentally induced apical periodontitis. *Int Endod J* 2007;40:282-289.

Trope M, Delano EO, Ørstavik D. Endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: single vs. multivisit treatment. *J Endod* 1999;25:345-50.

Trope M, Pettigrew JP, Barnett F, Tronstad L. Differentiation of radicular cyst and granulomas using computerized tomography. *Endod Dent Traumatol* 1989;5:69-72.

Tsai CH, Chen YJ, Huang FM, Su YF, Chang YC. The upregulation of matrix metalloproteinase-9 in inflamed human dental pulps. *J Endod* 2005;31:860-2.

van der Stelt PF. Experimentally produced bone lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985;59:306-12.

van der Zee E, Everts V, Beertsen W. Cytokine-induced endogenous procollagenase stored in the extracellular matrix of soft connective tissue results in a burst of collagen breakdown following its activation. *J Periodontal Res* 1996;31:483-8.

Vandenbergh B, Jacobs R, Yang J. Detection of periapical bone loss using digital intraoral and cone beam computed tomography images: an in vitro assessment of bony and / or infrabony defects. *Dentomaxillofacial Radiology* 2008;37:252-60.

Velvart P, Hecker H, Tililinger G. Detection of the apical lesions and the mandibular canal in conventional radiography and computed tomography. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;92:682-8.

Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem* 2007;15:2223-68.

Vier FV, Figueiredo JAP. Prevalence of different periapical lesions associated with human teeth and their correlation with the presence and extension of apical external root resorption. *Int Endod J* 2002;35:710-9.

Villarreal-Ramírez E, Moreno A, Mas-Oliva J, Chávez-Pacheco JL, Narayanan AS, Gil-Chavarría I, *et al.* Characterization of recombinant human cementum protein 1 (hrCEMP1): primary role in biomineralization. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;384:49-54.

von Stechow D, Balto K, Stashenko P, Müller R. Three-dimensional quantitation of periradicular bone destruction by micro-computed tomography. *J Endod* 2003;29:252.

Wahlgren J, Maisi P, Sorsa T, Sutinen M, Tervahartiala T, Pirilä E, *et al.* Expression and induction of collagenases (MMP-8 and -13) in plasma cells associated with bone-destructive lesions. *J Pathol* 2001;194:217-24.

Wahlgren J, Salo T, Teronen O, Luoto H, Sorsa T, Tjäderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in pulpal and periapical inflammation and periapical root-canal exudates. *Int Endod J* 2002;35:897-904.

Wahlgren J, Väänänen A, Teronen O, Sorsa T, Pirilä E, Hietanen J, *et al.* Laminin-5 gamma 2 chain is colocalized with gelatinase-A (MMP-2) and collagenase-3 (MMP-13) in odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med* 2003;32:100-7.

Walker KF, Lappin DF, Takahashi K, Hope J, MacDonald DG, Kinane DF. Cytokine expression in periapical granulation tissue as assessed by immunohistochemistry. *Eur J Oral Sci* 2000;108:195-201.

Wang CY, Stashenko P. The role of interleukin-1 $\alpha$  in the pathogenesis of periapical bone destruction in a rat model system. *Oral Microbiol Immunol* 1993;8:50-6.

Wang W, Xu J, Kirsch T. Annexin-mediated Ca<sup>2+</sup> influx regulates growth plate chondrocyte maturation and apoptosis. *J Biol Chem* 2003;278:3762-9.

Waterman-Junior PA, Torabinejad M, McMillan PJ, Kettering JD. Development of periradicular lesions in immunosuppressed rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:720-5.

Weiger R, Rosendahl R, Löst C. Influence of calcium hydroxide intracanal dressing on the prognosis of teeth with endodontically induced periapical lesions. *Int Endod J* 2000;33:219-26.

Williams MY, Mealey BL, Hallman WW. The role of computerized tomography in dental implantology. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1992;7:373-80.

Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991;2145-54.

Wu MK, Dummer PMH, Wesselink PR. Consequences of and strategies to deal with residual post-treatment root canal infection. *Int Endod J* 2006;39:343-56.

Wu MK, Shemesh H, Wesselink PR. Limitations of previously published systematic reviews evaluating the outcome of endodontic treatment. *Int Endod J* 2009;42:656-66.

Xu J, Wang W, Kapila Y, Lotz J, Kapila S. Multiple differentiation capacity of STRO-1+ / CD146+ PDL mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev* 2009;18:487-96.

Yamaguchi T, Chattopadhyay N, Kifor O, Sanders JL, Brown EM. Activation of p42/44 and p38 mitogen-activated protein kinases by extracellular calcium-sensing receptor agonists induces mitogenic responses in the mouse osteoblastic MC3T3-E1 cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:363-8.

Yamaguchi T. The calcium-sensing receptor in bone. *J Bone Miner Metab* 2008;26:301-11.

Yamasaki M, Kumazawa M, Kohsaka T, Nakamura H. Effect of methotrexate-induced neutropenia on rat periapical lesion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;77:655-61.

Yamasaki M, Morimoto T, Tsuji M, Akihiro I, Maekawa Y, Nakamura H. Role of IL-2 and helper T-lymphocytes in limiting periapical pathosis. *J Endod* 2006;32:24-9.

Yan SJ, Blomme EAG. In situ zymography: a molecular pathology technique to localize endogenous protease activity in tissue sections. *Vet Pathol* 2003;40:227-36.

Yang WK, Kim MR, Lee Y, Son HH, Lee W. Effect of calcium hydroxide-treated *Prevotella nigrescens* on the gene expression of matrix metalloproteinase and its inhibitor in MG63 cells. *J Endod* 2006;32:1142-5.

Yang ZH, Zhang XJ, Dang NN, Ma ZF, Xu L, Wu JJ, *et al.* Apical tooth germ cell-conditioned medium enhances the differentiation of periodontal ligament stem cells into cementum / periodontal ligament-like tissues. *J Periodontal Res* 2009;44:199-210.

Zayzafoon M, Fulzele K, McDonald JM. Calmodulin and calmodulin-dependent kinase II $\alpha$  regulate osteoblast differentiation by controlling c-fos expression. *J Bio Chem* 2005;280:7049-59.

Zayzafoon M. Calcium / Calmodulin signaling controls osteoblast growth and differentiation. *J Cell Biochem* 2006;97:56-70.

Zitzmann NU, Krastl G, Hecker H, Walter C, Weiger R. Endodontics or implants? A review of decisive criteria and guidelines for single tooth restorations and full arch reconstructions. *Int Endod J* 2009;42:757-74.

## APÊNDICE

APÊNDICE A- Médias e desvios-padrão dos parâmetros hematológicos e componentes bioquímicos sanguíneos dos animais em diferentes períodos experimentais e respectivos valores de referência

Parâmetros hematológicos e componentes bioquímicos sanguíneos	Unidade	Tempo						Valores de referência*
		Inicial		Após 45 dias		Após 180 dias		
		Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	
<b>Hemograma Completo</b>								
<b>Série Vermelha</b>								
Eritrócitos	$\times 10^6 / \mu\text{l}$	5,83	0,91	5,55	0,58	5,6	0,91	5,5-8,5
Hemoglobina	g / dl	13,1	2,16	12,8	1,4	12,65	2,09	12-18
Hematócrito	%	40,53	6,34	39,66	4,37	38,86	6,23	37-55
V.C.M. (volume corpuscular médio)	fL	69,57	2,67	71,47	2,27	69,58	4,12	66-77
C.H.C.M. (concentração de hemoglobina corpuscular média)	%	32,2	0,79	31,48	2,76	32,53	0,7	31-36
<b>Série Branca</b>								
Leucócitos	$\times 10^3 / \mu\text{l}$	10,9	3,93	11,36	2,89	10,66	3,03	6,0-17
Neutrófilos	$\times 10^3 / \mu\text{l}$	6,88	2,59	5,96	1,51	5,58	2,19	3,0-11
Eosinófilos	$\times 10^3 / \mu\text{l}$	0,58	0,51	71,72	1,03	0,81	0,76	0,1-1,2
Linfócitos	$\times 10^3 / \mu\text{l}$	3,42	1,28	4,06	1,64	3,54	1,44	1-5
Monócitos	$\times 10^3 / \mu\text{l}$	0,7	2,31	0,61	2,91	0,73	0,33	0,1-1,3
<b>Plaquetas</b>	$\times 10^3 / \mu\text{l}$	240,68	84,82	346,66	40,1	224,36	47,85	200-500
<b>Exame sérico</b>								
Fosfatase alcalina	U / L	74,66	29,05	75,08	56,44	58,4	32,45	33-102
TGP	U / L	53,26	78,99	44,41	44,4	38,86	24,54	21-73

\* Kaneko (1989)

APÊNDICE B- Trabalhos resultantes desta tese até o presente momento.

### Trabalhos completos publicados

- 1 **Paula-Silva FWG**, Ghosh A, Silva LAB, Kapila YL. TNF-alpha promotes an odontoblastic phenotype in dental pulp cells. *J Dent Res* 2009;88:339-44.
- 2 **Paula-Silva FWG**, Wu MK, Silva LAB, Leonardo MR, Wesselink PR. Accuracy of periapical radiography and cone-beam computed tomography in diagnosing apical periodontitis using histopathological findings as a gold standard. *J Endod* 2009;35:1009-12.
- 3 **Paula-Silva FWG**, Hassan B, Silva LAB, Leonardo MR, Wu MK. Outcome of root canal treatment in dogs determined by periapical radiography and cone-beam computed tomography scans. *J Endod* 2009;35:723-6.
- 4 **Paula-Silva FWG**, D'Silva NJ, Silva LAB, Kapila YL. High matrix metalloproteinase activity is a hallmark of periapical granulomas. *J Endod* 2009;35:1234-42.
- 5 **Paula-Silva FWG**, Santamaria-Júnior M, Leonardo MR, Consolaro A, Silva LAB. Cone-beam computerized tomographic, radiographic, and histologic evaluation of periapical repair in dogs' post-endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009. Available online 5 September 2009, ISSN 1079-2104, DOI: 10.1016/j.tripleo.2009.06.016.

### Resumos publicados

- 1 **Paula-Silva FWG**, Ghosh A, Silva LAB, Kapila YL. TNF-alpha promotes an odontoblastic phenotype in dental pulp cells. *J Dent Res* 2009;88A.
- 2 **Paula-Silva FWG**, Leonardo MR, Wu MK, Silva LAB. CT Scan evaluation of periapical repair after root canal treatment. *J Dent Res* 2008;37B.
- 3 **Paula-Silva FWG**, Ghosh A, Silva LAB, Kapila YL. Latent TNF-alpha mediated expression of MMPs by pulp versus PDL cells. *J Dent Res* 2008;87B.
- 4 **Paula-Silva FWG**, Leonardo MR, Wu MK, Silva LAB. Tomographic, radiographic and microscopic evaluation of periapical repair after root canal treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107:e31.
- 5 **Paula-Silva FWG**, Ghosh A, Arzate H, Kapila S, Silva LAB, Kapila YL. Indução da diferenciação de células do ligamento periodontal em cementoblastos pelo hidróxido de cálcio envolve a expressão de proteína do cemento-23 via quinases reguladas por sinal extracelular (ERK-1 / ERK-2). *Anais da XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE)* 2009;24:114.
- 6 **Paula-Silva FWG**, Ghosh A, Arzate H, Kapila S, Silva LAB, Kapila YL. Calcium hydroxide

promotes cementogenesis and induces cementoblastic differentiation of PDL cells in a CEMP-1 and ERK-dependent manner. *Braz Oral Res* 2009;23:18.

#### **Trabalhos apresentados em eventos nacionais e internacionais**

- 1 **Paula-Silva FWG**, Ghosh A, Silva LAB, Kapila YL. TNF-alpha promotes an odontoblastic phenotype in dental pulp cells. IADR/AADR/CADR 87th General Session and Exhibition, 2009, Miami, EUA.
- 2 **Paula-Silva FWG**, Leonardo MR, Wu MK, Silva LAB. CT Scan evaluation of periapical repair after root canal treatment. 37th Annual Meeting & Exhibition of the American Association for Dental Research, 2008, Dallas, EUA.
- 3 **Paula-Silva FWG**, Ghosh A, Silva LAB, Kapila YL. Latent TNF-alpha mediated expression of MMPs by pulp versus PDL cells. 86th General Session & Exhibiton of the International Association for Dental Research and 32nd Annual Meeting of the Canadian Association for Dental Research, 2008, Toronto, Canadá.
- 4 **Paula-Silva FWG**, Leonardo MR, Wu MK, Silva LAB. Tomographic, radiographic and microscopic evaluation of periapical repair after root canal treatment. 59th Annual Session of the American Academy of Oral and Maxillofacial Radiology, 2009, Pittsburgh, EUA.
- 5 **Paula-Silva FWG**, Ghosh A, Arzate H, Kapila S, Silva LAB, Kapila YL. Indução da diferenciação de células do ligamento periodontal em cementoblastos pelo hidróxido de cálcio envolve a expressão de proteína do cimento-23 via quinases reguladas por sinal extracelular (ERK-1 / ERK-2). XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), 2009, Águas de Lindóia, Brasil.
- 6 **Paula-Silva FWG**, Ghosh A, Arzate H, Kapila S, Silva LAB, Kapila YL. Calcium hydroxide promotes cementogenesis and induces cementoblastic differentiation of PDL cells in a CEMP-1 and ERK-dependent manner. 26a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2009, Águas de Lindóia, Brasil.

#### **Menção Honrosa**

Menção honrosa pela apresentação do trabalho “Indução da diferenciação de células do ligamento periodontal em cementoblastos envolve a expressão de CP-23 via quinases reguladas por sinal extracelular (ERK-1 / ERK-2)”, na XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE) em 2009.

## ANEXOS

**ANEXO A** - Ofício de aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais.



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Campus de Ribeirão Preto**  
*Comissão de Ética no Uso de Animais*

## CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 07.1.192.53.6), intitulado: "Correlação Entre o Reparo Microscópico, Radiográfico e Tomográfico, após Tratamento de Canal Radicular em Dentes de Cães com Vitalidade Pulpar e com Necrose Pulpar e Lesão Periapical", de autoria de **Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva** e de **Léa Assed Bezerra da Silva**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 14.02.2008.

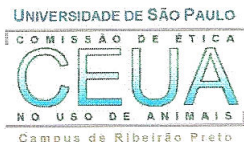
Ribeirão Preto, 15 de fevereiro de 2008

  
Presidente da CEUA  
Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos

  
Secretaria da CEUA  
Maria Angélica Depiro



**ANEXO B - Ofício de aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais.**



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Campus de Ribeirão Preto**  
*Comissão de Ética no Uso de Animais*

**CERTIFICADO**

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 07.1.191.53.0), intitulado: "Expressão das Metaloproteinases da Matriz de Mediadores da Inflamação Após Tratamento Endodôntico em Dentes de Cães com Vitalidade Pulpar e Necrose Pulpar e Lesão Periapical Visível Radiograficamente", de autoria de **Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 05.06.07.

Ribeirão Preto, 11 de junho de 2007

  
Presidente da CEUA  
Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos

  
Secretária da CEUA  
Maria Angélica Depiro

**ANEXO C - Ofício do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.**



Health Sciences Institutional Review Board (IRB) • 540 East Liberty Street, Suite 202, Ann Arbor, MI 48104-2210 • phone (734) 936-0933 • fax (734) 998-9171 • irbhsbs@umich.edu

**To:** Yvonne Kapila

**From:**  
Charles Kowalski  
Richard Redman

**Cc:**  
Nisha D'Silva  
Yvonne Kapila  
Francisco Silva

**Subject:** Notice of Determination of "Not Regulated" Status for [HUM00017046]

**SUBMISSION INFORMATION:**

Title: Expression of Matrix Metalloproteinases and Inflammatory Mediators in Human Periapical Granulomas and Periapical Cysts

Full Study Title (if applicable):

Study eResearch ID: [HUM00017046](#)

Date of this Notification from IRB: 11/5/2007

Date of IRB Not Regulated Determination : 11/5/2007

**IRB NOT REGULATED STATUS:**

Category	Description
Research Involving Coded Private Information	The IRB reviewed your application and determined that this study involves only coded private information or biological specimens that cannot be linked to a specific individual by the investigator(s) directly or indirectly through a coding system. In accordance with OHRP guidance on this subject (See <a href="http://www.hhs.gov/ohrp/humansubjects/guidance/cdebiol.htm">http://www.hhs.gov/ohrp/humansubjects/guidance/cdebiol.htm</a> ), IRB approval is not required as the data cannot be tracked to a human subject.

Handwritten signatures of Richard W. Redman and Charles J. Kowalski.

**Richard Redman**  
Co-chair, IRB Health Sciences

**Charles Kowalski**  
Co-chair, IRB Health Sciences

# 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](#)