

TRATAMENTO QUÍMICO DE FRAGMENTOS DENTÁRIOS IMPLANTADOS NO SUBCUTÂNEO DE RATOS: UMA ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE ÁCIDO CÍTRICO E CLORIDRATO DE TETRACICLINA

(Rattus Norvegicus-var. Albinus Rodentia Mammalia)

CHEMICAL TREATMENT OF DENTAL FRAGMENTS IMPLANTED IN RATS SUBCUTANEOUS TISSUE: A COMPARATIVE ANALYSIS BETWEEN CITRIC ACID AND TETRACYCLINE-HCl

Liane Cassol Argenta ARAGONES*

Aguinaldo CAMPOS Jr**

Keila Barreto MEIRA***

Euloir PASSANEZI****

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo comparar a efetividade de duas substâncias químicas, ácido cítrico (AC) pH 2,0 e cloridrato de tetraciclina (CT) a 2%, quando aplicadas em fragmentos dentários humanos durante 3 minutos e implantados no subcutâneo de ratos. Foram feitos 8 grupos, variando o período, 30 e 60 dias. Grupo 1: Raspagem(R)+CT; Grupo 2: R+AC; Grupo 3: Polimento(P)+CT; Grupo 4: P+AC; Grupo 5: CT; Grupo 6: AC; Grupo 7: Fragmento normal; Grupo 8: Fragmento com doença periodontal (DP). De acordo com os resultados estatísticos obtidos pode-se concluir que as substâncias químicas comportaram-se de modo semelhante quando considerados os diversos parâmetros avaliados.

UNITERMOS

Ácido cítrico; Tetraciclina; Canal radicular, descontaminação.

* Aluna do curso de Pós-Graduação em Periodontia, ao nível de Doutorado, da FOB-USP.

** Professor Doutor da disciplina de Periodontia da FOB-USP.

*** Aluna do curso de Pós-Graduação em Periodontia, ao nível de Mestrado, da FOB-USP.

**** Professor Titular da Disciplina de Periodontia da FOB-USP.

GRUPO 5

Os fragmentos com DP receberam aplicação de CT a 2% por 3 minutos e foram implantados no subcutâneo do lado direito do animal.

GRUPO 6

Os fragmentos dentários obtidos dos dentes humanos com DP receberam tratamento tópico com ácido cítrico pH 2,0 por 3 minutos e após feita lavagem com solução salina estéril. O ácido foi aplicado no fragmento implantado no lado esquerdo do animal. Nestes 2 últimos grupos foram usados 20 animais, onde os 10 primeiros foram sacrificados aos 30 dias e os outros 10 aos 60 dias.

GRUPO 7

Fragmentos dentários obtidos de raízes periodontalmente saudáveis foram implantadas no subcutâneo do lado esquerdo do animal, não sendo realizado nenhum procedimento mecânico ou químico sobre os fragmentos dentários.

GRUPO 8

Fragmentos dentários obtidos de raízes periodontalmente doentes foram implantadas no subcutâneo do lado direito do animal. Não foi realizado nenhum procedimento mecânico ou químico sobre esses fragmentos. Nestes 2 últimos grupos foram utilizados 20 animais, onde os primeiros 10 foram sacrificados com 30 dias e os outros 10 com 60 dias.

Os animais foram sedados com éter etílico e foi realizada uma incisão na região dorsal, com lâmina Bard-Parker nº11, e a aponeurose foi divulsionada com tesoura de ponta romba para que os fragmentos fossem colocados sobre o tecido muscular do animal; posteriormente era feita sutura com fio de seda 4-0 em pontos isolados.

Depois de 30 e 60 dias após as intervenções cirúrgicas, os animais foram sacrificados com "overdose" de éter etílico e as biópsias foram então obtidas através de nova incisão para que os fragmentos pudessem ser removidos com tecido conjuntivo circunjacente.

As peças obtidas foram fixadas em formol 10% tamponado com PO₄ a 0,1M com pH 7,0; durante aproximadamente 24 horas. As peças foram processadas da maneira convencional para inclusão em parafina e coradas com hematoxilina-eosina (HE). Posteriormente foram feitas observações em microscópio ótico, onde foi realizada a contagem de

fibras e células do tecido conjuntivo localizado junto à porção correspondente ao cimento radicular, portanto em posição oposta ao lado pulpar do fragmento dentário.

RESULTADOS

Os fibroblastos no Grupo 1 estiveram em número estatisticamente diferentes do Grupo 2, Grupo 3, Grupo 6 e Grupo 7, sendo que o Grupo 1 mostrou-se superior em produzir a proliferação de fibroblastos. O Grupo 5 foi estatisticamente diferente dos grupos 6 e 7, neste caso a tetraciclina foi mais eficiente com relação à indução da proliferação destas células. A maior média para fibroblastos foi do Grupo 5 seguido pelo Grupo 1, Grupo 6, Grupo 8, Grupo 2, Grupo 7 e Grupo 3 para o período de 60 dias.

Para fibras as maiores médias estavam nos grupos 7 e 8 para o período de 30 dias. Para o período de 60 dias as maiores médias estavam no Grupo 4, Grupo 7, Grupo 3 e Grupo 2; sendo que o Grupo 4 mostrou-se estatisticamente diferente dos grupos 6, 7 e 8. O Grupo 7 foi diferente somente do Grupo 8.

Quando foram consideradas o total de células inflamatórias, não foram observadas diferenças importantes entre os grupos, no período de 60 dias. As maiores médias estavam no Grupo 1, Grupo 5 e Grupo 6. O Grupo 1 mostrou-se estatisticamente diferente dos Grupos 3, 4, 7 e 8; e o Grupo 6 foi diferente do Grupo 7.

A inserção de fibras ao fragmento dentário, mostrou uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,001$) entre os grupos no período de 30 dias, onde os maiores percentuais de inserção concentraram-se no Grupo 4, Grupo 6 e Grupo 7. Também para o período de 60 dias houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,023$), somente nos grupos 1 e 3 não foram observadas fibras inseridas ao fragmento dentário.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para ambos os períodos de 30 dias ($p=0,249$) ou 60 dias ($p=0,245$), no que se refere à reabsorção.

Com relação à espessura da cápsula fibrosa não houve diferença entre os grupos, sendo $p=0,188$ para o período de 30 dias e $p=0,182$ para o período de 60 dias.

DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo comparar duas substâncias de aplicação tópica, ácido cítrico e tetraciclina ácida, com relação aos seus efeitos sobre a

superfície radicular, bem como a indução de formação de fibras conjuntivas inseridas ou não em fragmentos dentários implantados no subcutâneo de ratos. Além disso, foi analisado o potencial antigênico dos fragmentos dentários após a aplicação tópica destas substâncias, através da contagem de células inflamatórias em microscópio ótico.

Trabalhos experimentais têm sugerido a presença de endotoxinas bacterianas dentro do cimento periodontalmente envolvido e tem sido sugerida a remoção destas endotoxinas através de alisamento radicular^{3,15}. Porém em microscopia eletrônica é mostrado um leito superficial hipermineralizado no cimento envolvido e o alisamento radicular tem sido preconizado para a remoção deste leito^{11,15}. Os efeitos citotóxicos do cimento envolvido *in vitro* pode ser devido à ligação de endotoxina, que é um LPS componente da parede celular de bactérias Gram negativas^{2,3,13} e a remoção destes LPS constitui o maior objetivo do alisamento radicular^{2,3,15}.

Trabalhos usando modelos animais e dentes humanos extraídos têm expandido o conhecimento sobre o uso da desmineralização com ácido cítrico para aumentar a inserção do tecido conjuntivo^{8,12,24}. Estes trabalhos sugerem que o condicionamento com ácido cítrico das superfícies radiculares expostas promove o estabelecimento da inserção de tecido conjuntivo após o tratamento cirúrgico¹⁶ e também parece que a exposição direta do tecido conjuntivo periodontal normal ao ácido cítrico não resulta em efeitos deletérios irreversíveis a este tecido^{10,24}.

REGISTER²² mostrou que a desmineralização da dentina com ácido cítrico promoveu melhor inserção histológica na cicatrização do retalho e maior formação de osso e novo cimento, quando comparado com o controle não tratado pelo ácido cítrico.

No presente trabalho foi encontrado que o nível de inserção, considerando todos os grupos no período de 60 dias, foi maior para o Grupo 6, seguido pelos grupos 4 e 8 e grupos 2, 5 e 7. Para o período de 30 dias os maiores percentuais de inserção estão no Grupo 6 e grupos 4, 7 e 8. REGISTER; BURDICK²¹ encontraram reinserção acelerada sobre a dentina radicular cirurgicamente exposta e desmineralizada *in situ*, com vários agentes desmineralizadores. RIRIE et al²³ também encontraram uma cicatrização mais avançada, com relação à maturação do tecido conjuntivo e restabelecimento da inserção periodontal.

A reabsorção radicular não teve diferenças significantes entre os grupos, tanto para o período de 30 dias ($p=0,249$) quanto para o período de 60 dias ($p=0,245$). As áreas de reabsorção ocorrem devido à atividade das células do tecido conjuntivo sobre o fragmento radicular. Em humanos a reabsorção radicular pode ser evitada através da migração apical do epitélio, impedido assim, o contato do tecido conjuntivo com a raiz dentária ou pelo repovoamento da ferida cirúrgica por células advindas do ligamento periodontal. Estudo realizado em humanos por SEABRA²⁴, foi comparado o tratamento da superfície radicular isoladamente e em associação com técnica de cicatrização dirigida. Foi observado que houve menor reabsorção nas áreas onde foi usado somente ácido, porém não foi uma diferença significativa.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de 30 e 60 dias, quando foi avaliada a espessura da cápsula fibrosa. Neste estudo foi observado que as fibras colágenas na maioria das vezes estavam orientadas paralelamente à superfície radicular; este fato foi também observado por ISIDOR et al¹⁴. NYMAN et al¹⁹ não observaram inserção de tecido conjuntivo sobre as superfícies radiculares que tiveram ligamento periodontal removido; e ainda que a cicatrização é determinada pelo tipo de células que repovoam a área. AUKIL et al^{4,5} sugeriram que a nova inserção de tecido conjuntivo é aumentada se os procedimentos cirúrgicos forem realizados de modo a permitir uma população seletiva das superfícies radiculares curetadas, pelas células oriundas do ligamento periodontal.

As células inflamatórias como um todo, não mostraram diferenças importantes entre os grupos. O Grupo 1 mostrou maior contagem de células inflamatórias do que os grupos 3, 4, 7 e 8, com diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Talvez a tetraciclina-HCl não tenha removido totalmente o "smear layer", resultante da raspagem da superfície radicular, e isto tenha provocado um maior aporte das células inflamatórias. Neste trabalho pode ser observado que os plasmócitos estiveram mais presentes no período de 60 dias do que no período de 30 dias.

Para um nível de significância de $p \geq 0,05$, os grupos 1 e 2 tiveram uma diferença estatisticamente significativa com relação aos fibroblastos ($p=0,000$), para o período de 60 dias, mostrando um resultado aparentemente superior da tetraciclina -HCl sobre o ácido cítrico, em induzir a proliferação destas células.

Com exceção dos grupos 5 e 8, todos os grupos apresentaram uma maior quantidade de fibroblastos para o período de 60 dias, o que já era esperado, pois com o esgotamento do potencial antigênico e diminuição de células inflamatórias, toma lugar a proliferação de células fibroblásticas, com o objetivo de encapsular o fragmento dentário. Quando os fibroblastos são reproduzidos *in vitro*, parece que eles são incapazes de regenerar o ligamento periodontal¹⁸, portanto mesmo que se tenha conseguido uma proliferação real de fibroblastos, é provável que, em humanos, não se teria nova inserção, no máximo uma reinserção.

TERRANOVA et al²⁶ observaram que o tratamento da superfície de dentina com tetraciclina-HCl aumentou a adesão de fibronectina, a qual estimula a aderência e crescimento dos fibroblastos, enquanto suprime a aderência e crescimento epidermal.

O uso de animais no trabalho em foco visa facilitar a comparação entre as substâncias desmineralizadoras, bem como seus efeitos sobre os fragmentos radiculares contaminados. Admite-se limitações quanto à metodologia, pois até certo ponto, os resultados não podem ser extrapolados diretamente para os seres humanos, uma vez que neste modelo não existe a recontaminação dos fragmentos dentários e acredita-se que há um esgotamento dos produtos antigênicos e, portanto a reação inflamatória pode ser subestimada. Neste modelo de estudo não foi permitida a migração apical do epitélio, nem mesmo a recontaminação por parte das bactérias e seus produtos, por ser um modelo fechado; e ainda, os resultados mostraram uma extrema variação entre os grupos.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas contidas neste trabalho são inicialmente a transformação em arco-seno dos valores obtidos. Foram realizados: Análise de Variância, Teste de Tukey a 95% e Análise Discriminante.

CONCLUSÕES

Analisando as diversas variáveis deste trabalho foi possível constatar que o Grupo 1 mostrou-se superior em induzir a proliferação de fibroblastos, no período de 60 dias. O Grupo 4 mostrou uma maior quantidade de fibroblastos que os grupos 5, 6 e 8. Uma extrapolação que pode ser feita é que, provavelmente, a não remoção de contaminantes através da raspagem ou polimento tenha provocado uma maior proliferação de fibroblastos no sentido de encapsular o fragmento

dentário. Com base nos resultados, pareceu que a tetraciclina ácida não foi eficiente em induzir a inserção de fibras quando associada à raspagem ou polimento, talvez pela não remoção de toda a camada de "smear layer". Como não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação à reabsorção dos fragmentos dentários, conclui-se que o ácido cítrico não aumenta a reabsorção radicular.

Com base nos resultados, dentro das limitações da metodologia empregada, pode ser concluído que as duas substâncias químicas utilizadas apresentaram-se de modo semelhante quando considerados os diversos parâmetros avaliados, utilizados ou não com a raspagem prévia. A grande variação de resultados apresentados não possibilita uma conclusão linear sobre a eficácia dos procedimentos, pois a repercussão dos tratamentos sobre as diversas variáveis estudadas é extremamente ampla.

ABSTRACT

This study was undertaken to compare the effectiveness of two chemical substances, citric acid pH 2,0 and tetracycline-HCl 2,0%, to treatment of periodontal disease. Decalcification of the root surface was accomplished by citric acid for 3 minutes or tetracycline for 3 minutes. The fragments were implanted in the subcutaneous tissue of 80 rats. The animals were divided into 8 groups, they were sacrificed after 30 and 60 days of implantation. The groups were treated in the following way:

Group 1:Scaling+tetracycline-HCl

Group 2:Scaling+citric acid

Group 3:Polishing+tetracycline-HCl

Group 4:Polishing+citric acid

Group 5:Tetracycline-HCl

Group 6:Citric acid

Group 7:Normal tooth(negative control)

Group 8:Periodontal disease(positive control)

Based on the statistical results it was concluded that the two chemical substances used showed similar performance when considered the several measurement parameters. The large variation of results makes difficult to conclude about the effectiveness of the procedures, due to the great number of variants obtained in this study.

UNITERMS

Citric Acid; Tetracyclines; Root canal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALEO, J.J.; VANDERSALL, D.C. Cementum. Recent concepts related to periodontal. Disease therapy. **Dent. Clin. N. Amer.**, v.24, n.4, p. 627-50, Oct.1980.
2. ALEO, J.J. et al. The presense and biologic activity of cementum-bound endotoxin. **J. Periodont.**, v.45, n.9, p.672-5, Sept.,1974.
3. ALEO, J.J.; DE RENZIS F.A.; FARBER, P.A. In vitro attachment of human gingival fibroblasts to root surfaces. **J. Periodont.**, v.46, n.11, p. 639-45, Nov. 1975.
4. AUKHIL, I.; PETTERSON, E.; SUGGS, C. Periodontal wound healing in the absence of periodontal ligament cells. **J. Periodont.**, v.58, n.2, p.71-7, Feb. 1987.
5. AUKHIL, I.; SIMPSON, D.M.; SCHABERG, T.V. An experimental study of new attachment procedure in beagle dogs. **J. Periodont. Res.**, v.18, n.6, p.643-54, Dec. 1983.
6. BOGLE, G. et al. New attachment after surgical treatment and acid conditioning of roots in naturally occurring periodontal disease in dogs. **J. Periodont. Res.**, v.16, n.1, p.130-33, Jan. 1981.
7. CATON, J.; NYMAN, S.; ZANDER, H. Histometric evaluation of periodontal surgery. II. Connective tissue attachment levels after four regenerative procedures. **J. Clin. Periodont.**, v.7, n.3, p.224-31, Mar. 1980.
8. COLE, R.T. et al. Connective tissue regeneration to periodontally diseased teeth. A histological study. **J. Periodont. Res.**, v.15, n.1, p.1-9, Jan. 1980.
9. COMMON, J.; MCFALL JR., W.T. The effects of citric acid on attachment of laterally positioned flaps. **J. Periodont.**, v.54, n.1, p.9-18, Jan. 1983.
10. CRIGGER, M.; RENVERT, S.; BOGLE, G. The effect of topical citric acid application on surgically exposed periodontal attachment. **J. Periodont. Res.**, v.18, n.3, p.303-5, May 1983.
11. GARRET, J. S. Root planing: A perspective. **J. Periodont.**, v.48, n.9, p.553-57, Sept. 1977.
12. GARRETT, J.S.; CRIGGER, M.; EGELBERG, J. Effects of citric acid on diseased root surfaces. **J. Periodont. Res.**, v.13, n.2, p.155-63, Mar. 1978.
13. HATFIELD, C.G.; BAUMHAMMERS, A. Cytotoxic effects of periodontally involved surfaces of human teeth. **Archs oral Biol.**, v.16, p.465-68, Apr.1971.
14. ISIDOR, F. et al. New attachment formation on citric acid treated roots. **J. Periodont. Res.**, v.20, n.4, p.421-30, July 1985.
15. JONES, W.A.; O'LEARY, J.T. The effectiveness of in vivo root planing in removing bacterial endotoxin from the roots of periodontally involved teeth. **J. Periodont.**, v.49, n.7, p.337-42, 1978.
16. KARRING, T. et al. New attachment formation on citric acid and non-citric acid treated roots. **J. Periodont. Res.**, v.19, n.6, p.666-69, Dec. 1984.
17. LÖE, H. et al. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan Laborers 14 to 46 years of age. **J. Clin. Periodont.**, v.13, n.5, p.431-40, May 1986.
18. McCULLOCH, C.A.G.; BORDIN, S. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. **J. Periodont. Res.**, v.26, p.144-154, 1991.
19. NYMAN, S. et al. Healing following reimplantation of teeth subjected to root planning and citric acid treatment. **J. Clin. Periodont.**, v.12, n.4, p.294-305, Apr. 1985.
20. PITARU, S. et al. Cell migration attachment and orientation in vitro are enhanced by partial demineralization of dentine and cementum and inhibited by bacterial endotoxin. **J. Periodont. Res.**, v.19, n.6, p.661-65, Dec. 1984.
21. REGISTER, A.A.; BURDICK, F.A. Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized in situ. **J. Periodont.**, v.45, n.11, p.646-55, Nov. 1975.
22. REGISTER, A.A. Bone and cementum induction by dentin, desmineralized in situ. **J. Periodont.**, v.44, n.1, p.49-54, Jan. 1973.
23. RIRIE, C.M.; CRIGGER, M.; SELVIG, K.A. Healing of periodontal connective tissues following surgical wounding and application of citric acid in dogs. **J. Periodont. Res.**, v.15, n.3, p.314-27, May 1980.
24. SEABRA, E.G. **Tratamento de bolsas periodontais supra-ósseas: análise comparativa entre o tratamento ácido da superfície radicular isoladamente e em associação com a técnica de cicatrização dirigida.** Bauru, 1990. Tese (Doutorado)- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
25. SYSTAT for Windows: Statistics, Version 5 Edition. Evanston. IL: SYSTAT, Inc., 750p. 1992.
26. TERRANOVA, V.P. et al. A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth. **J. Periodont. Res.**, v.21, n.4, p. 330-37, July 1986.
27. WIKESJÖ, U.M.E. et al. A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment conditions dentin surfaces. **J. Periodont. Res.**, v.21, n.4, p.322-29, July 1986.
28. WIRTHLIN, M.R.; HANCOCKS, S. Chemical treatment of diseased root surfaces in vitro. **J. Periodont.**, v.52, n.11, p.694-96, Nov. 1981.