

# **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INFLAMATÓRIO DE RAÍZES HUMANAS COM DOENÇA PERIODONTAL APÓS TRATAMENTO COM RASPAGEM MANUAL E ULTRA-SÔNICA**

*EVALUATION OF THE INFLAMMATORY POTENTIAL OF HUMAN ROOTS WITH PERIODONTAL DISEASE AFTER MANUAL AND ULTRA-SONIC SCALING*

**Marta GONZALES RIESCO**

*Aluna de pós-graduação a nível de mestrado em Periodontia da FOB - USP*

**Aguinaldo CAMPOS JUNIOR**

*Professor Associado do Departamento de Periodontia da FOB - USP*

**A**valiou-se a reação inflamatória provocada por fragmentos radiculares de dentes humanos, com doença periodontal tratados por duas técnicas de instrumentação e implantados no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos. Dez dentes foram divididos em 4 partes, de modo a constituir 4 grupos de estudo. Os fragmentos pertencentes ao grupo I foram extraídos da área contaminada pela bolsa periodontal e não sofreram nenhum tratamento; os do grupo II foram provenientes da porção saudável. O grupo III constituiu-se de fragmentos contaminados tratados com raspagem ultra-sônica e os do grupo IV tratados com raspagem manual. Os fragmentos foram implantados no dorso do animal e as biópsias realizadas após 30 dias. Para avaliação destes tratamentos utilizou-se a morfometria de células inflamatórias e estruturas de reparo.

A análise estatística dos resultados mostrou que, sob o ponto de vista do infiltrado inflamatório, não houve diferença significativa com relação ao volume de células inflamatórias entre os grupos II, III, IV. Porém, houve diferença entre esses grupos e o grupo I, de modo que os fragmentos do grupo I apresentaram um volume maior de células inflamatórias, especialmente linfócitos. Foi possível concluir a necessidade de instrumentação da superfície radicular, visto que em relação ao infiltrado, os grupos que sofreram tratamento mecânico apresentaram um volume de células inflamatórias semelhante ao grupo controle. Ambas as técnicas foram eficientes frente aos parâmetros avaliados.

**UNITERMOS:** Endotoxinas; Lipopolissacarídeos; Raspagem manual; Instrumentação ultrasônica.

## INTRODUÇÃO

A manutenção da saúde periodontal é um estado relativamente estável através do estabelecimento de um equilíbrio entre os microorganismos da placa e o hospedeiro, compatível com mínima destruição tecidual e rápida regeneração ou reparo das estruturas danificadas. As alterações nesse equilíbrio podem resultar no desenvolvimento e progressão da doença periodontal. Uma das principais formas de destruição tecidual durante a evolução da doença periodontal deve-se a liberação e fixação ao cimento de produtos lipopolissacarídeos (LPS) provenientes da parede celular de bactérias gram-negativas<sup>6</sup>.

A citotoxicidade associada a raízes contaminadas por doença periodontal foi proposta por HATFIELD; BAUMHAMMERS<sup>7</sup>, em 1971, após observarem que a incubação de células epiteliais com raízes contaminadas resultava em processo degenerativo da célula.

ALEO et al<sup>8</sup>, em 1974, aventaram a hipótese da contaminação do cimento por LPS, pois através de metodologia específica para extração de LPS conseguiu-se obter esse componente da superfície radicular de dentes com doença periodontal.

Os fatores tóxicos liberados por microorganismos estão associados tanto com o processo de destruição dos tecidos periodontais como com o bloqueio do processo regenerativo, já que são fatores citotóxicos. Um dos objetivos da terapia periodontal é o restabelecimento das estruturas periodontais perdidas pela doença, seja através de um epitélio juncional longo ou de uma nova inserção conjuntiva ou ainda da regeneração dos tecidos com formação de novo osso, novo cimento e novo ligamento. Esses objetivos dificilmente podem ser alcançados se a superfície cementária não estiver livre de contaminantes<sup>16</sup>. Sobre dentes com doença periodontal, observou-se ausência de aderência celular<sup>7</sup> e inibição de crescimento de fibroblastos<sup>13</sup>. Dentre as terapias utilizadas para o tratamento da doença periodontal, a raspagem e o alisamento radicular são as mais antigas e extensamente estudadas. Porém, é ainda controversa a quantidade de estrutura dentária que deve ser removida para obtenção de uma superfície saudável. FINE et al.<sup>7</sup>, em 1980 utilizando técnicas, *in vitro* para identificação de LPS detectaram a presença de endotoxinas no interior do cimento. No entanto, em 1982, NAKIB et al.<sup>15</sup> através de imunofluorescência observaram que as ligações químicas entre o cimento e os LPS são fracas e que esses compostos podem ser removidos por escovação. Resultados histológicos que suportam essa teoria foram obtidos por NYMAN et al.<sup>17</sup> em 1986, que verificaram que áreas com doença periodontal tratadas

apenas com polimento com taça de borracha apresentavam resposta tecidual semelhante às áreas onde todo o cimento havia sido removido.

Na década de 70 foram desenvolvidos vários modelos *in vitro* e *in vivo* para avaliação da efetividade das diversas técnicas. Os modelos em animais possibilitam a avaliação histológica em diferentes fases do processo regenerativo, assim como o efeito que o sistema imune do hospedeiro exerce sobre os contaminantes. No modelo utilizado neste estudo optou-se pela padronização do ambiente da interface entre raiz e tecido subcutâneo de ratos, uma vez que, além de apresentar resposta inflamatória e imunológica, o procedimento realizado com retalho fechado não permite a recontaminação por bactérias ou seus produtos e tampouco a interferência do epitélio no processo regenerativo.

O objetivo deste estudo foi avaliar a necessidade de tratamento da superfície radicular, através de análise histológica da resposta inflamatória originada após a implantação no tecido subcutâneo de ratos, de fragmentos radiculares contaminados e tratados com raspagem manual e ultrasônica.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 10 dentes extraídos devido a doença periodontal, os quais foram lavados com solução fisiológica isotônica de cloreto de sódio a 0,9% e armazenados sob refrigeração a 4°C.

Removeu-se uma secção transversal da porção correspondente à bolsa periodontal e outra correspondente à porção sadia. Sobre a secção contaminada, foram realizados os seguintes tratamentos: Em 1/3 da superfície, raspagem manual com curetas, no segundo terço, toques com ponta ultrasônica. O fator limitante da raspagem foi o toque com a ponta de uma sonda clínica. No último terço não foi realizado nenhum tratamento.

Em seguida essas seções foram cortadas com brocas e formaram-se quatro grupos de estudo. Grupo I fragmentos contaminados não tratados; Grupo II fragmentos obtidos da secção não contaminada; Grupo III fragmentos contaminados tratados com ponta ultra-sônica; Grupo IV fragmentos contaminados tratados com raspagem manual.

Os fragmentos foram implantados no tecido conjuntivo subcutâneo do dorso de 10 ratos albinos, adultos machos Wistar (*Rattus norvegicus* - var. *albinus*). Cada animal recebeu um fragmento de cada grupo. Os animais foram sacrificados após 30 dias da implantação. Para preparação histológica, utilizaram técnicas de desmineralização em EDTA pH 7,2 a 5% por 15 dias sob agitação. O processamento histológico foi convencional para

inclusão em parafina e as secções com espessura de 6 µm foram coradas com hematoxilina-eosina.

Para a avaliação histológica utilizou-se um microscópio binocular contendo no plano focal de uma de suas oculares um retículo de integração de Weibel composto de 21 linhas de comprimento "1", cujas extremidades representam 42 pontos testes. Em campos histológicos aleatórios foram contados e registrados os pontos-testes que coincidem com estruturas em estudo e o número total de pontos sobre todo o tecido presente nos campos (42 pontos/campo). A análise histológica quantitativa baseou-se na volumetria de pontos, que é uma das técnicas do método estereológico. Em cada um dos grupos estudados contaram-se 3000 pontos, obtendo-se um erro padrão em torno de 5%, conforme cálculo realizado em estudo piloto<sup>1</sup>.

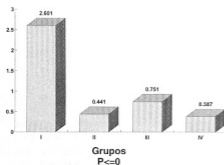
Os constituintes teciduais avaliados neste estudo foram os seguintes: neutrófilos, linfócitos, plasmócitos, macrófagos, células gigantes, fibroblastos, vasos sanguíneos, outros tipos celulares e espaços vazios. O item espaços vazios incluía fibras do tecido conjuntivo assim como o líquido intersticial.

## RESULTADOS

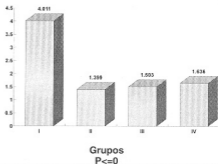
A análise quantitativa dos dados propiciou a comparação objetiva do componente celular da resposta inflamatória ao redor dos diversos fragmentos radiculares. Para tanto utilizou-se uma análise univariada para a comparação da quantificação numérica entre os diversos tipos celulares e demais estruturas.

A análise estatística mostrou diferenças significantes apenas para as seguintes estruturas: linfócitos, vasos sanguíneos e soma de células inflamatórias.

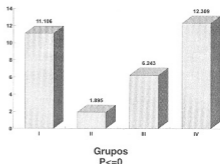
**Gráfico 1:**  
**MÉDIA DO NÚMERO DE LINFÓCITOS**



**Gráfico 2:**  
**MÉDIA DA SOMATÓRIA DAS CÉLULAS INFLAMATÓRIAS**



**Gráfico 3:**  
**MÉDIA DO NÚMERO DE VASOS**



## DISCUSSÃO

Os modelos em animais possibilitam a avaliação histológica em diferentes fases do processo, assim como o efeito que o sistema imune pode exercer sobre os contaminantes. No modelo utilizado neste estudo optou-se pela padronização do ambiente entre raiz e o tecido subcutâneo de ratos para evitar a reagudização do processo por recontaminação por bactérias. O fragmento foi mantido *in situ* por 30 dias. Acredita-se que após esse período, ao redor de todos os fragmentos já haviam ocorrido reações agudas. Prova disso foi o pequeno número de neutrófilos observado em todos os grupos.

Os LPS presentes no cimento contaminado podem

atuar como fatores quimiotáticos para neutrófilos, ativar o complemento e levar a produção de outros fatores quimiotáticos<sup>6</sup>. Porém, como o modelo utilizado foi de 30 dias, sem que ocorresse recontaminação, a quantidade de antígeno se esgotou e o processo inflamatório caminhou para a cronicização em todos os grupos.

No gráfico 1 observa-se diferença estatisticamente significativa para linfócitos entre o grupo I e os demais grupos. O grupo I apresenta número significativamente maior, provavelmente devido a uma alta concentração de fatores tóxicos.

O ingresso dos linfócitos no foco inflamatório é mais tardio do que os polimorfonucleares e de maior intensidade nas inflamações crônicas. Portanto, em um modelo de 30 dias era esperado um infiltrado mononuclear.

Com relação à soma de células inflamatórias, observa-se no gráfico 2 o mesmo fenômeno do gráfico 1, ou seja, um número estatisticamente maior apenas no grupo I. Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos II, III, IV. Conclui-se que ambos os tratamentos, ultra-som e raspagem manual, sob o ponto de vista da resposta inflamatória são capazes de tornar as raízes semelhantes às dos fragmentos não contaminados.

Portanto, quanto à efetividade na obtenção de uma superfície livre de LPS, parece haver um consenso entre os pesquisadores de que tanto curetas manuais como ultrassônicas são efetivas. CHECCHI; PELICCIONI<sup>7</sup> em 1988 utilizaram, como metodologia para comparação, a cultura de fibroblastos de rim de macacos e verificaram que o crescimento celular ocorre sobre superfícies radiculares tratadas por ambas as terapias.

Utilizando o teste LAL (*Limulus Amoebocyte Lysate*), específico para detecção de LPS como método de avaliação de efetividade de tratamento, JONES; O'LEARY<sup>11</sup>, em 1978, concluíram que a raspagem manual é efetiva na redução da concentração de LPS da superfície radicular contaminada. Resultado semelhante foi obtido por SMART et al.<sup>19</sup>, em 1990 na avaliação da raspagem ultrassônica.

Estes resultados podem ser suportados pelo estudo de 1982 de NAKIB et al.<sup>15</sup>, no qual através do teste LAL, verificaram que os LPS se aderem fracamente à superfície radicular. A resposta histológica obtida no estudo de NYMAN et al.<sup>17</sup> de 1986, onde resposta semelhante foi verificada em áreas contaminadas tratadas com polimento com taça de borracha e áreas tratadas com completa remoção do cimento, nos leva a concluir que a extensa remoção de cimento com finalidade de eliminar endotoxinas não se justifica.

Paralelamente, técnicas imunohistoquímicas foram efi-

cientes em demonstrar LPS apenas na superfície do cimento exposto à bolsa periodontal, aderindo-se ao cimento sem invadi-lo<sup>10</sup>.

As reações vasculares acompanharam os padrões celulares da resposta inflamatória. Analisando-se o gráfico 3, pode-se observar diferença estatisticamente significativa para o número de vasos sanguíneos. O tratamento que obteve resposta vascular mais discreta foi o ultra-som, não apresentando diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo não contaminado.

Outro fenômeno observado neste estudo foi a presença em todos os espécimes de fibras colágenas de orientação paralela ao fragmento radicular, formando uma cápsula fibrosa.

Retomando o modelo de implantação de fragmentos em animais, ressalta-se o estudo de 1980 de NYMAN et al.<sup>16</sup>, no qual, raízes com doença periodontal foram raspadas e reimplantadas em cavidades ósseas criadas em áreas edêntulas dos referidos animais. Os autores observaram que sobre as áreas previamente expostas às bolsas periodontais não houve formação de nova inserção, porém esse fenômeno pôde ser observado nas áreas onde o ligamento havia sido preservado.

Isso pode explicar a obtenção de fibras paralelas às raízes observadas neste estudo. Ressalta-se que apenas a exclusão do epitélio e descontaminação radicular não são suficientes para obtenção de inserção conjuntiva.

Apesar de alguns estudos afirmarem que não há necessidade de eliminação profunda do cimento, parece lícito crer que faz-se necessário o tratamento radicular embora a técnica utilizada não seja tão relevante, ainda que considerando-se significante a lisura da superfície em relação ao potencial de recolonização pela placa bacteriana<sup>4,8,12,14</sup>.

Ocorre, de maneira geral, uma redução do infiltrado inflamatório após o tratamento mecânico da raiz, até mesmo pelo esgotamento do potencial antigênico do cimento recoberto por LPS. Porém, deve ser ressaltado que o modelo empregado no presente estudo não reproduz a relativa permeabilidade do epitélio juncional.

A busca de soluções regenerativas que impliquem em substituição do epitélio por fibras conjuntivas inseridas na superfície radicular pressupõe a procura justamente de uma solução, que entre outras vantagens, reduza o potencial de troca de informações antigênicas entre o sulco gengival e o tecido conjuntivo subjacente, papel este exercido eficazmente pelas fibras da inserção conjuntiva.

A formação de cápsula fibrosa de orientação paralela à raiz significa, a princípio, a ausência ou o fracasso na capacidade de inserção à raiz. Porém há indícios de que a própria instrumentação, ao mesmo tempo em que produz

a eliminação de contaminantes, pode agregar o "smear layer", uma camada de material microcristalino que poderia estar impedindo a exposição de matriz colágena, fator tão importante na formação de fibras inseridas<sup>18</sup>. Assim, pode-se concluir que talvez a reinserção possa ser obtida com a conjugação de tratamento mecânico radicular e aplicação de terapia química.

## CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos pela análise estatística dos parâmetros utilizados para a realização deste estudo, podemos concluir que:

1. Houve redução do infiltrado inflamatório ao redor dos fragmentos tratados pelas duas técnicas de instrumentação, quando comparado com o fragmento não tratado.
2. O volume de células inflamatórias ao redor dos fragmentos tratados pelas duas técnicas foi semelhante a dos fragmentos não contaminados.
3. A formação de cápsula fibrosa foi um evento presente em todos os grupos estudados. As fibras conjuntivas apresentaram-se paralelas sem que houvesse inserção ao cimento.
4. A ausência de inserção pode ser associada a presença do "smear layer" e a ausência de ligamento periodontal.
5. Utilizando essa metodologia não foi possível afirmar a eficácia da raspagem do ponto de vista da retenção de placa.
6. Em vista dos resultados obtidos neste estudo e em concordância com outros estudos, o tratamento mecânico deve sempre ser realizado.

## ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the inflammatory response induced in the subcutaneous tissue of rats by human dental roots, previously contaminated by periodontal disease and treated by two different procedures. Ten teeth were divided into 4 parts to be submitted to the following treatments: on one of the diseased sides, it was performed scaling and root planing by curettes (group IV); on one other side, ultrasonic treatment (group III); on the third one, nothing was done (group I). The fourth fragment was removed from a healthy portion of the teeth (group II). Standardized fragments of these teeth were implanted in the subcutaneous tissue of 10 rats and after 30 days, the biopsies were performed.

The histological analysis using morphometry of inflammatory cells and repair structures showed the following results. Considering the total amount of inflammatory cells, there was a statistical difference between the group I and the groups II, III and IV. The group I presented the highest number of inflammatory cells, specially lymphocytes. It was attributed to the type of trial used in this study, where the fragments were left isolated from the environment for 30 days. It was concluded that both treatments are efficient to reduce the bacterial products to a level compared to the healthy roots.

**UNITERMS:** Endotoxin; Lipopolysaccharides; Scaling and root planing; Ultrasonic instrumentation

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHERNE, W.A.; DUNNILL, M.S. **Morphometry**. London, Edward Arnold, 1982.
2. ALEO, J.J. et al. The presence 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. BENFENATI, M.P. et al. Scanning electron microscope: an SEM study of periodontally instrumented root surfaces, comparing sharp, dull, and damaged curettes and ultrasonic instruments. **Int. J. Periodont. Restorat. Dent.**, v.7, n.2, p.50-67, Feb. 1987.
5. CHECCHI, L.; PELLICIONI, G.A. Hand versus ultrasonic instrumentation in the removal of endotoxins from root surfaces *in vitro*. **J. Periodont.**, v.59, n.6, p. 398-402, June 1988.
6. DALY, G.C. et al. Bacterial endotoxin, a role in chronic inflammatory periodontal disease. **J. oral Pathol.**, v.9, n.1, p.1-15, Jan. 1980.
7. FINE, D. H. et al. Preliminary characterization of material eluted from the roots of periodontally diseased teeth. **J. Periodont. Res.** v.15, n.1, p.10-19, Jan. 1980.
8. GARNICK, J.J.; DENT, J.A. A scanning electron micrographical study of root surfaces and subgingival bacteria after hand and ultrasonic instrumentation. **J. Periodont.**, v.60, n.8, p.441-7, Aug. 1989.
9. HATFIELD, C.G.; BAUMHAMMERS, S.A. Cytotoxic effects of periodontally involved surfaces of human teeth. **Arch. oral Biol.** v.16, p.465-8, Apr. 1971.

10. HUGHES, F.J.; SMALES, F.C. Immunohistochemical investigation of the presence and distribution of cementum-associated lipopolysaccharides in periodontal disease. **J. Periodont. Res.**, v.21, n.6, p.660-7, Nov.1986.
11. JONES, W.A.; O'LEARY, T.J. 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, July 1978.
12. LAYMAN, D.L.; DIEDRICH, D.L. Growth inhibitory effects of endotoxins from *Bacteroides gingivalis* and intermedius on human gingival fibroblasts *in vitro*. **J. Periodont.**, v.58, n.6, p.387-92, June 1987.
13. LIE, T.; MEYER, K.; Calculus removal and loss of tooth substance in response to different periodontal instruments. A scanning electron microscope study. **J. Periodont.**, v.4, n.4, p. 250-62, Nov. 1977.
14. MCCOY, S. et al. The concentration of lipopolysaccharide on individual root surfaces at varying times following *in vivo* root planing. **J. Periodont.**, v.58, n.6, p.393-9, June 1987.
15. NAKIB, N.M. et al. Endotoxin penetration into root cementum of periodontally healthy and diseased human teeth. **J. Periodont.**, v.53, n.6, p.368-78, June 1982.
16. NYMAN, S. et al. Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. **J. clin. Periodont.**, v.7, n.5, p.394-401, 1980.
17. NYMAN, S. et al. Role of diseased root cementum in healing following treatment of periodontal disease. An experimental study in the dog. **J. Periodont. Res.**, v.21, n.5, p.496-503, 1986.
18. POLSON, A.M. et al. The production of a root surface smear layer by instrumentation and its removal by citric acid. **J. Periodont.**, v.55, n.8, p.443-6, Aug. 1984.
19. SMART, G. S. et al. The Assessment of metasonic root surface debris by determination of residual endotoxin levels. **J. clin Periodont.**, v.17, n.3, p.174-8, mar. 1990.