LIANA LINHARES LIMA

Cirurgiã-Dentista

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA QUE O CEMENTO DENTAL PODE EXERCER SOBRE A MODULAÇÃO GÊNICA DURANTE O PROCESSO DE REGENERAÇÃO PERIODONTAL. ESTUDO EM HUMANOS

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Clínica Odontológica - Área de Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Jr.
Co-orientador: Prof.Dr.Sérgio de Toledo

PIRACICABA
2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA

BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

L628a

Lima, Liana Linhares.

Avaliação da influência que o cemento dental pode exercer sobre a modulação gênica durante o processo de regeneração periodontal. Estudo em humanos. / Liana Linhares Lima. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2007.

Orientadores: Francisco Humberto Nociti Junior, Sérgio de Toledo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Periodontia. 2. Reação em cadeia da polimerase. I. Nociti Junior, Francisco Humberto. II. Toledo, Sérgio de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Effect the dental cementum on genes modulate during periodontal regeneration. Study in humans

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Periodontics. 2. Polymerase chain reaction

Área de Concentração: Periodontia

Titulação: Mestre em Clínica Odontológica

Banca Examinadora: Francisco Humberto Nociti Junior, Patrícia Furtado Gonçalves, Márcio Zaffalon Casati

Data da Defesa: 14-02-2007

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica

UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 14 de Fevereiro de 2007, considerou a candidata LIANA LINHARES LIMA aprovada.

PROF. DR. FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JÚNIOR

PROFa. DRa. PATRICIA FURTADO GONÇALVES

PROF. DR. MÁRCIO ZAFFALON CASATI

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, com muito carinho...

Aos meus amados pais, **José Barbosa** e **Maria Benedita,** por estarem ao meu lado com dedicação, amor, carinho e confiança em toda minha trajetória. Sempre apoiaram todas as minhas decisões, me incentivando a buscar o melhor tanto na vida pessoal como profissional. A vocês, por tudo, minha eterna gratidão!

Aos meus irmãos queridos, **Anali** e **Alisson**, meus maiores e queridos amigos.

E a toda a minha linda **família**.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus** em primeiro lugar, que sempre guiou meus passos, iluminando o meu caminho e me conduzindo para o bem. Agradeço-lhe pela minha vida, por tudo o que sou e alcancei até hoje. Agradeço-lhe por me acolher como filha amada e por me consolar em momentos difíceis, me dando a força necessária para seguir em frente, segundo a Sua vontade.

"Esforça-te, e tem bom ânimo; não pasmes, nem te espantes; porque o Senhor teu Deus é contigo, por onde quer que andares" (Josué 1:9)

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Francisco Humberto Nociti Junior**, por sua inestimável contribuição na minha formação. Agradeço-lhe por ter confiado em mim e me concedido à oportunidade de trabalhar contigo.

Ao Prof. Dr. **Antonio Wilson Sallum**, pelo exemplo de profissionalismo, experiência e dedicação à carreira acadêmica. Do seu exemplo surgiu o meu amor pela docência e pela Periodontia.

Ao Prof. Dr. **Enilson Antônio Sallum**, pela amizade, exemplo de dedicação à pesquisa, pelo apoio, pelo incentivo e todas as oportunidades a mim concedidas durante o mestrado.

Ao Prof. Dr. **Márcio Zaffalon Casati**, pelo exemplo de profissionalismo e, sobretudo, pela amizade e toda a atenção dispensada durante este curso. Aprendi a admirá-lo como amigo, orientador e profissional.

Ao Prof. Dr. **Sérgio de Toledo**, pela grande contribuição em minha formação. A sua serenidade, enorme coração e bondade o fazem ser admirado por todos.

À amiga **Eliete Aparecida Ferreira Lima**, pela grande amizade, simplicidade, competência e pelos incomensuráveis auxílios prestados durante o curso de pós-graduação. Sem você nada seria possível.

À **Mariana Piovezan Fugolin**, pela grande amizade, ajuda indispensável na execução da parte laboratorial deste trabalho e pelos momentos agradáveis de convivência no laboratório.

Ao **Vitor Emmanuel Bouças da Silva**, pelo seu apoio e estímulo desde o inicio, obrigada por ter sido, antes de tudo, meu verdadeiro amigo.

Ao **Wagner Filho**, pessoa indispensável na realização dessa tese. Pela disponibilidade e pelo esforço em fazer com que tudo acontecesse da melhor forma possível. Sobretudo pela enorme amizade e companheirismo em todos os momentos.

Aos meus grandes amigos e colegas de turma, **Beatriz Bezerra, Renato Casarin**, **Fabrícia Suaid**, **Thais Gonçalves, Kamille Barbosa, Daniela Feitosa, Mauro Santamaría** e **Fernanda Ribeiro** companheiros de todas as horas, continuarei levando a nossa amizade aonde quer que eu vá. Crescemos e aprendemos juntos, e temos o orgulho de dizer que também fizemos crescer e aprender.

AGRADECIMENTOS

Ao Excelentíssimo Senhor Prof. Dr. José Tadeu Jorge, magnífico reitor da Universidade Estadual de Campinas.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp na pessoa do seu diretor, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto e Prof. Dr. Marcelo de Castro Meneghim

Ao Prof. Dr. Mário Alexandre Coelho Sinhoreti coordenador geral dos cursos de pós-graduação da FOP/Unicamp. A Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia coordenadora do curso de pós-graduação em Clínica Odontológica da FOP/Unicamp.

Ao Prof. Dr. Marcelo Mesquita, chefe do Departamento de Prótese e Periodontia. Ao Prof. Dr. Enilson Antônio Sallum, responsável pela área de Periodontia.

À FAPESP pelo apoio na forma de bolsa e reserva técnica de mestrado indispensável para a execução deste trabalho.

À FAEPEX pelo auxilio financeiro dado a este trabalho.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, em especial à D.Cida e Rosângela, que sempre nos recebem com sorrisos na Clínica de Especialização.

Às minhas amigas-irmãs Fernanda Ferreira Lopes, Maria Carmem Rodrigues, Valéria Pereira e Gláucia Xavier, pela grande amizade e agradável convívio durante minha vida. Mesmo que a distância nos separe, são pessoas que sei que posso contar em qualquer momento.

A todas as moradoras e hóspedes da Travessa Dom Luiz de Bragança 373, e à própria casa em si, por ser meu primeiro lar e tão querido de 2003 a 2005.

A todos os meus amigos conquistados em Piracicaba e que não caberiam nesta página, por terem compartilhado comigo tantos momentos agradáveis. Em especial à Vanessa, Daiane, Lóci, Eliete, Mariana, Marcela e Patfu por terem segurado a minha barra em momentos difíceis e demonstrado o verdadeiro valor da amizade sincera.

Aos demais amigos queridos da Periodontia, alunos das turmas de mestrado e doutorado, Bruno Benatti, Cléverson Silva, Daiane Peruzzo, Érica Del Peloso, Gabriela Cruz, Guilherme Zanatta, Marcelo Carvalho, Sandro Bittencourt, Saulo Cabral, Fabrícia Suaid, Fernanda Ribeiro, Mauro Santamaría, Renato Casarin, Wagner Filho, Beatriz Bezerra, Thais Gonçalves, Roberta Tunes, Kamille Pontarolli e Daniela Feitosa. Obrigada pela amizade e companheirismo, tornando a convivência dentro da pós-graduação sempre melhor.

A você, que eu possa ter esquecido, mas se julga meu amigo (a), e eu tenho certeza que é.

Meus sinceros agradecimentos...

“Não há outra maneira de aprender a não ser nos conhecendo
transformando nossos medos e limitações em
força e alegria.
Essa é a principal lição”.
(Brian Weiss)

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi caracterizar o perfil de expressão gênica do tecido de granulação formado em defeitos infraósseos tratados pelo princípio da RTG, na presença ou não de cemento dental. Para isto, foram selecionados 30 pacientes portadores de periodontite crônica e com pelo menos um dente apresentando defeito do tipo vertical sem envolvimento endodôntico e indicado para extração. Os pacientes foram divididos em dois grupos experimentais de acordo com seu histórico de terapia periodontal prévia ou não: Controle: remoção do tecido de granulação e uma cuidadosa raspagem e alisamento radicular, utilizando curetas e brocas, objetivando a completa remoção dos depósitos duros e moles e do cemento radicular e Teste: a remoção do tecido de granulação, destacamento de cálculos grosseiros e descontaminação radicular com micro escovas e soro fisiológico objetivando a preservação do cemento radicular. Em ambos os grupos, os defeitos foram tratados com o princípio da Regeneração Tecidual Guiada (Goretex®), os retalhos foram posicionados coronariamente e suturados. Após 21 dias, o tecido formado sob a membrana foi coletado e armazenado para extração do RNA total e análise por meio do PCR quantitativo (PCRq), o dente foi extraído e avaliado histológicamente. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste t de Student com nível de significância de 0,05 e foram agrupados de acordo com a função de cada gene: genes relacionados ao processo de formação óssea/cementária - fosfatase alcalina, osteopontina, "receptor activator of NF-kβ ligand" (RANKL) e osteoprotegerina não apresentaram diferença estatística entre os grupos controle e teste. Porém quando avaliados os níveis de mRNA de osteocalcina (OCN) (3,84±1,01 e 1,83±0,57; p=0,001), colágeno I (3,98±1,07 e 2,85±0,99; p=0,024), colágeno III (2,59±0,99 e 1,39±0,76; p=0,008), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-1) (1,78±0,45 e 2,53±0,40; p=0,001) fator de crescimento de fibroblasto (bFGF) (7,07±1,20 e 9,77±2,35;p=0,005) e sialoproteína óssea (BSP) (16,43±3,93 e 23,34±3,19; p=0,001) foi encontrada uma diferença estatística entre os grupos. Genes relacionados à inflamação: interleucina 1ß(IL-1ß) e interleucina 6 (IL-6) observou-se que não houve diferença estatística entre os grupos, porém para IL-4 (14,89±4,14 e 24,01±7,00; p=0,002) houve uma maior expressão deste gene no grupo teste. Quanto aos genes relacionados à degradação da matriz: para a MMP-2 houve uma diferença estatística no nível de mRNA entre os grupos (1,72±0,18 e 1,27±0,27; p=0,001), enquanto que para a MMP-9 não foi encontrada nenhuma diferença estatística. Dentro dos limites do presente estudo, pode-se concluir que o cemento dental pode modular o processo de regeneração periodontal

regulando a expressão dos genes PDGF-1, bFGF, BSP , IL-4 ,OCN , Col I e Col III .

Palavras-chave: Periodontia, Reação da polimerase em cadeia.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the influence of the dental cementum on gene

expression during periodontal regeneration. Thirty patients were selected presenting chronic periodontal disease and with at least one tooth presenting vertical bone defect without endodontic involvement and referred to extraction. The patients were divided into two groups according to history or not of periodontal therapy: Control: Scaling and root planning was made by means of hand and rotators instruments in order to remove soft and hard deposits as well as all root cementum; Test: Removal of only soft microbial deposits and cleaning of the root surface with micro brush was performed with the aim to preserve maximum root cementum. Both groups were treated with guided tissue regeneration (GTR), with non reasonable membranes (Goretex®) covering the buccal and lingual aspects of the defect and the flaps were coronally positioned and sutured. After 21 days, the tissue formed under the membrane was collected and stored for polymerase chain reaction (PCR) analysis; the tooth was extracted and submitted to histological evaluation. Data analysis did not show any statistical difference between the two experimental groups and the following genes expression: alkaline phosphatase, osteopontin (OPN), "receptor activator of NF-kβ ligand" (RANKL), osteoprotegerin (OPG), interleukin 1 (IL-1ß), interleukin 6 (IL-6) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9). On the other hand, the presence of dental cementum significantly affected the following genes: osteocalcin (OCN) (3.84±1.01 and 1.83±0.57; p=0.001), type I collagen (3.98±1.07 and 2.85±0.99; p=0.024), type III collagen (0.55±0.15 and 0.45±0.13;p=0.008), platelet - derived growth factor (PDGF) (1.78±0.45 and 2.53±0.40;p=0.001), matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) (1.72±0.18 e 1.27±0.27; p=0.001) and interleukin 4 (IL-4) (14.89±4.14 e 24.01±7.00; p=0.002). Therefore, within the limits of this study, it can be concluded that dental cementum can modulate periodontal regeneration.

Key words: Periodontics, Polimerase chain reaction.

SUMÁRIO

CAPÍTULOS	Página
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	04

2.1 Características gerais do cemento dental	04
2.2 Tipos de cemento	05
2.3 Contaminação do cemento dental	06
2.4 Padrões de remoção do cemento dental	10
2.5 Regeneração dos tecidos periodontais e do cemento dental	13
3. PROPOSIÇÃO	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Amostra	20
4.2 Delineamento do estudo	20
4.3 Procedimentos cirúrgicos	21
4.4 Extração do RNA	25
4.5 Transcrição reversa	25
4.6 Desenho dos “primers”	26
4.7 Otimização da reação	28
4.8 Processamento histológico	29
4.9 Microscopia eletrônica de varredura	29
4.10 Análise Estatística	30
5. RESULTADOS	31
5.1 Observações Clínicas	31
5.2 Observações Histológicas	31
5.3 Observações da microscopia eletrônica de varredura	31
5.4 Resultados da expressão gênica	34
6. DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50
ANEXO	60

1 – INTRODUÇÃO

A raspagem e alisamento radicular são as formas de terapia mecânica mais comumente empregadas em periodontia. Têm sido utilizados para descontaminação radicular, não somente no tratamento de doenças periodontais, como também empregados na manutenção da saúde do periodonto após a terapia e na prevenção da doença recorrente (Lindhe & Nyman, 1984). O objetivo da raspagem e alisamento radicular é remover cálculo e depósitos bacterianos sobre a superfície radicular, assim como o cemento dental contaminado pelas bactérias e seus produtos (Aleo *et al.*, 1975; Jones & O'Leary, 1978; Nishimine & O'Leary, 1979). Os efeitos clínicos da raspagem e alisamento radicular estão de uma forma geral, bem documentados e, em combinação com uma boa higiene oral, resultam na diminuição da profundidade de sondagem das bolsas e na estabilização das medidas do nível clínico de inserção, particularmente em bolsas periodontais profundas (Kaldahl *et al.*, 1993).

A superfície radicular contaminada parece ser biologicamente incompatível com os tecidos periodontais adjacentes. Essa incompatibilidade pode ser atribuída à presença do biofilme bacteriano subgengival (Christersson *et al.*, 1991), ao cálculo subgengival (Mandel & Gaffer, 1986) e ao biofilme bacteriano aderido à superfície deste cálculo (Friskopp & Hammarström, 1980). Entretanto a contaminação do cemento dental tem sido bastante contestada, sendo motivo de muitas investigações na década de 80 (Daly *et al.*, 1979, 1980 e 1982). A idéia de que superfícies de dentes humanos periodontalmente comprometidas exerceriam efeitos citotóxicos sobre os tecidos foi proposta inicialmente por Hatfield & Baumhammers (1971). O fato foi corroborado por Morrisen (1972 e 1975), que observou a citotoxidade de raízes dentais humanas com doença periodontal, implantadas em abdome de ratos. Aleo *et al.* (1974 e 1975) demonstraram que a presença dos lipopolissacarídeos (LPS), endotoxinas derivadas da parede celular de bactérias gram-negativas, exercia um efeito biológico inibitório do crescimento de fibroblastos gengivais *in vitro*. Investigações subseqüentes (Jones & O´Leary,1978; Nishimine & O´Leary, 1979) sugeriram que os lipopolissacarídeos (LPS) eram absorvidos e penetravam no cemento dental, o que foi suportado também por estudos que identificaram um carboidrato próprio dos LPS infiltrado profundamente no cemento dental (Fine *et al.*, 1980). Entretanto, a visão oposta, de que os LPS estavam somente associados, e não ligados ao cemento dental, foi defendida por Daly *et al.* (1980) e Nakib *et al.* (1982), que demostraram que os LPS estavam fracamente aderidos e poderiam ser removidos

facilmente com uma simples escovação ou polimento dental.

A localização quase exclusiva dos LPS na superfície, e não no interior do cemento dental das raízes comprometidas periodontalmente, foi revelada por Moore (1986) e confirmada imunohistoquimicamente por Hughes & Smales (1986), que não encontraram uma provável infiltração sub-superficial por LPS no cemento dental. Em uma investigação subseqüente utilizando microscopia eletrônica de varredura, Hughes *et al*. (1988) mostraram que a maior parte dos LPS estava associada às bactérias, e não ao cemento dental. Mais tarde puderam confirmar este achado utilizando marcadores de anticorpos relacionados aos LPS (Nagasawa *et al*. 2002; Choi *et al*. 2003).Todos estes estudos apontam para o fato de que a significância clínica do LPS ligado ao cemento dental havia sido superestimada no passado, e que, além disso, um alisamento radicular muito intenso não mais se justificaria para remover este LPS sobre o cemento dental ou qualquer outra substância citotóxica presente, das quais o LPS é o marcador mais representativo (Smart *et al*, 1990).

Nyman *et al*, em 1986 e 1988 realizaram dois estudos (o primeiro em cães e o segundo em humanos) com o objetivo de avaliar se a instrumentação da superfície radicular deveria ou não incluir a remoção "total" do cemento dental para se obter saúde periodontal. Para isto, os autores compararam os resultados do tratamento A (remoção total do cemento com instrumentos rotatórios) e B (polimento da superfície radicular com taça de borracha e pasta profilática), ambos com acesso cirúrgico. Os resultados demonstraram, clinica e histologicamente, que o mesmo grau de saúde periodontal poderia ser atingido com os dois tipos de tratamento, o que levou os autores a concluir que a remoção intencional do cemento dental, com o objetivo de eliminar endotoxinas, não se justificaria do ponto de vista de melhora dos parâmetros clínicos.

Nesse contexto, as vantagens da preservação do cemento dental, o qual é fundamental para inserção de fibras colágenas do ligamento periodontal (Blömlof *et al*, 1987; Adriaens *et al*, 1988) devem ser consideradas. A resistência relativa do cemento dental à reabsorção (Brown, 1982), a prevenção da anquilose (Melcher, 1976) e a diminuição da ocorrência de hipersensibilidade dentinária após o tratamento (Wallace & Bissada, 1990) são pontos importantes, porém, de fundamental importância seria a preservação do cemento dental de modo que este pudesse modular o processo de regeneração periodontal.

Num estudo em cães detalhando aspectos estruturais e ultra-estruturais do periodonto após

regeneração tecidual guiada (RTG), Schüpbach *et al.* (1993) encontraram que a regeneração periodontal (com arquitetura e função completamente restauradas) somente ocorreu em partes da superfície radicular onde havia algum cemento dental remanescente ocasionalmente deixado após a instrumentação radicular, demonstrando um possível papel do cemento dental no processo de regeneração periodontal. Neste sentido Gonçalves *et al*, 2006, em um estudo também em cães, avaliaram histometricamente o potencial regenerativo do cemento em lesões de bifurcação classe III, induzidas por ligaduras, tratadas pelo princípio da RTG. Observou-se que, no grupo onde o cemento dental foi mantido houve uma maior porcentagem de novo cemento e novo osso, o que levou os autores a concluir que o cemento dental pode modular a regeneração periodontal obtida em defeitos de furca III em cães, tratados com RTG.

Entretanto, até o presente momento, não existem dados que elucidem os mecanismos envolvidos e a importância do cemento dental remanescente modulando os genes envolvidos no processo de cura obtida após a terapia periodontal, particularmente utilizando técnicas regenerativas. Apesar dos diferentes tipos de reparo periodontal ter sido extensamente documentados do ponto de vista clínico e histológico, a origem das células e sua regulação e diferenciação ainda não estão bem compreendidos (Egelberg, 1987; Aukhil *et al.*, 1990; Pitaru *et al.*, 1994) e, portanto estudos que demonstrem os mecanismos envolvidos neste processo estão justificados. Um outro aspecto de particular importância, que reforça a proposta do presente trabalho, são os achados de que proteínas da matriz dentinária, *in vitro*, modulam sinais regulatórios para a reparação e reabsorção dos tecidos dentais e periodontais (Silva *et al*. 2004 a, b e c). Assim, os constituintes da dentina agem nas células próximas, incluindo células do ligamento, osteoblastos, osteoclastos e células inflamatórias (Silva *et al.,* 2004a), causando uma intensa migração e maturação celular progressiva, de maneira dose-dependente (Lara *et al*., 2003), induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias por osteoblastos (Silva *et al*., 2004b) e o recrutamento de neutrófilos durante o processo patológico (Silva *et al*., 2004c). Desta forma, hipoteticamente, os componentes da matriz extracelular do cemento dental também poderiam modular os eventos celulares e moleculares durante a regeneração dos tecidos periodontais. O cemento dental poderia participar de forma direta ou indireta, modulando a resposta durante o processo de regeneração periodontal, uma vez que cementoblastos expressam fatores importantes (Strayhorn *et al*., 1999; Anusaksathien *et al*., 2004; Zhao *et al*., 2003 e 2004) e que a matriz orgânica do cemento dental é

composta por inúmeros fatores de crescimento (Cafesse & Quiñones, 1993; Lynch *et al*., 1989; Sigurdsson *et al*., 1995; Kinoshita *et al*., 1997 ;Giannobile *et al*., 1998) . Sendo assim, a proposta do presente estudo é caracterizar o perfil de expressão gênica do tecido de granulação formado em defeitos infraósseos tratados pelo princípio da RTG, na presença ou não de cemento dental.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Características gerais do cemento dental

O cemento é um tecido avascular e mineralizado que recobre toda a superfície radicular. Devido à sua posição intermediária, formando a interface entre a dentina e o ligamento periodontal, o cemento é um componente do dente, mas pertence funcionalmente ao aparato de inserção, ou seja, ao periodonto. Uma das principais funções do cemento é ancorar as fibras colágenas do ligamento periodontal à superfície radicular, mas ainda apresenta uma importante função reparativa e adaptativa, exercendo um papel crucial na manutenção da relação oclusal e protegendo a integridade da superfície radicular (Bosshardt & Selvig, 1997).

Anteriormente, o conhecimento sobre o desenvolvimento e a estrutura geral do periodonto estava limitado a informações morfológicas. Entretanto, na última década, houve um grande progresso no campo da biologia molecular e celular, o que veio a fornecer um melhor entendimento dos eventos que ocorrem durante o desenvolvimento e regeneração dos tecidos periodontais, incluindo o cemento dental.

O cemento dental é um tecido único em vários aspectos: é avascular e não inervado, não sofre remodelação contínua como o osso, mas continua a crescer em espessura ao longo do tempo (Bosshardt & Selvig, 1997). No nível molecular, o cemento parece ter seu desenvolvimento controlado por vários fatores reguladores em comum com os do osso alveolar (McNeil *et al*, 1998, Saygin *et al*, 2000).

Existem evidências histológicas de que o cemento é essencial para a maturação do periodonto, tanto durante o desenvolvimento quanto na regeneração periodontal (Saygin *et al*, 2000). Estudos recentes têm contribuído para o entendimento dos fatores moleculares envolvidos na regeneração do cemento dental (McNeil & Somerman, 1993), mas a cementogênese continua sendo pouco entendida em sua base biológica e celular.

2.2 – Tipos de cemento

Tradicionalmente, o cemento tem sido classificado em celular e acelular, dependendo da presença ou não de células (cementócitos) em sua estrutura. Outra classificação diz respeito à presença ou ausência de fibras colágenas intrínsecas ou extrínsecas em seu interior, formadas por cementoblastos ou fibroblastos, respectivamente (Jones, 1981; Schroeder, 1986). Com relação a estes aspectos, três tipos principais de cemento têm sido descritos em humanos.

O cemento acelular afibrilar cobre pequenas porções do esmalte dental, se estendendo sobre a junção cemento-esmalte. A localização deste tipo de cemento varia de dente para dente e ao longo da junção cemento-esmalte do mesmo dente (Schroeder & Scherle, 1988). Seus principais componentes estruturais são as glicosaminoglicanas (Schroeder, 1986) e sua significância funcional é desconhecida. A ausência de fibras colágenas indica que esta variedade de cemento não tem função de inserção.

O cemento celular de fibras intrínsecas contém cementócitos embebidos em uma matriz colágena rica em fibras. Estas fibras intrínsecas estão orientadas paralelamente à superfície radicular e têm um curso circular ao redor da raiz (Schroeder, 1986). Uma rápida deposição de matriz pelos cementoblastos, que ocorre no espaço entre as células derivadas da bainha epitelial de Hertwig e a superfície dentinária parece ser responsável pela incorporação de alguns cementoblastos, que se tornam os cementócitos aprisionados na matriz mineralizada (Bosshardt & Schroeder, 1991). O cemento celular de fibras intrínsecas é encontrado na região de bifurcação, na porção apical das raízes, em lacunas de reabsorção, em irregularidades e fendas de fratura radicular, o que evidencia uma importante função adaptativa, embora não tenha função direta de inserção. Somente este tipo de cemento é capaz de reparar áreas de reabsorção da superfície radicular num tempo razoável, devido à sua capacidade de deposição muito mais rápida que qualquer outro tipo de cemento (Bosshardt & Schroeder, 1991).

O cemento acelular de fibras extrínsecas é encontrado nas porções cervical e média da raiz, cobrindo cerca de 40 a 70% da superfície radicular. Em dentes anteriores, pode cobrir também parte da porção apical, já que sua extensão em direção apical aumenta de dentes posteriores para anteriores. Sua função é de inserção, ancorando as fibras do ligamento periodontal à raiz. Sua estrutura consiste de uma densa rede de fibras colágenas curtas implantadas na matriz dentinária (glicosaminoglicanas) e orientadas perpendicularmente à superfície radicular (Schroeder, 1986). Quando estas fibras se tornam alongadas e contínuas com as fibras principais do ligamento

periodontal, são denominadas de fibras de Sharpey (Schroeder, 1986). Embora o cemento acelular de fibras extrínsecas seja um tecido em crescimento constante, linhas aposicionais de crescimento podem ser identificadas, em associação com uma mudança abrupta na direção das fibras de Sharpey (Cho & Garant, 2000). Este tipo de cemento apresenta um nível de crescimento mais rápido nas superfícies distais (4,3μm/ano) que nas mesiais (1,4μm/ano) das raízes (Dastmalchi *et al*, 1990), o que sugere seu potencial de adaptação às demandas funcionais, como a resultante oclusal anterior e inclinação mesial. Em humanos, as fibras extrínsecas transpassam e se mesclam às fibras intrínsecas do cemento celular, formando uma rede densa de fibras extrínsecas e intrínsecas; este tipo de cemento é referido como cemento celular estratificado misto (Schroeder, 1986).

2.3 – Contaminação do cemento dental

Várias alterações patológicas ocorrem na superfície dental exposta ao ambiente da bolsa periodontal, em contato com as bactérias e seus produtos. A preocupação com a exposição do cemento às endotoxinas bacterianas, das quais o LPS é o representante mais estudado, formou a base biológica para a realização de uma extensiva raspagem e alisamento radicular, com o objetivo de remover a parte contaminada do cemento, além do biofilme e cálculo dental (Adelson *et al*, 1980; Aleo *et al*, 1974 and 1975; Bravman *et al*, 1979; Cogen *et al*, 1983; Karring *et al*, 1980;Daly *et al*, 1982; Maidwell-Smith *et al*, 1987; Wilson *et al*, 1986).

Aleo *et al* (1975) utilizaram fibroblastos gengivais humanos para estudar *in vitro* a adesão destas células à superfície radicular contaminada. Os autores verificaram que a porção contaminada de dentes extraídos com doença periodontal teve pouca ou nenhuma adesão de fibroblastos, enquanto que na porção remanescente não contaminada as células aderiram normalmente. A remoção mecânica do cemento contaminado (com raspagem e alisamento radicular) também resultou na adesão normal de fibroblastos à superfície radicular. Os autores concluíram que, extrapolando estes dados para uma situação *in vivo*, o sucesso clínico do tratamento periodontal dependeria de uma completa remoção das toxinas associadas ao cemento contaminado ou da remoção do próprio cemento.

Daly *et al* (1982) investigaram histologicamente a presença e localização dos lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) no cemento de 36 dentes com doença periodontal, comparados a dois dentes controle saudáveis. Os dentes foram descalcificados e cortes seriados foram corados para a detecção de LPS. Os resultados indicaram a presença destas endotoxinas

bacterianas penetrando cerca de 10 μm no cemento, embora houvesse a presença de depósitos bacterianos até próximo à junção cemento-dentinária. Os autores sugeriram que todo o cemento deveria ser removido durante a raspagem, para se obter uma superfície livre de contaminação.

Adriaens *et al* (1988) encontraram bactérias cultiváveis presentes na dentina (87% das amostras) e na polpa (59% das amostras) de dentes com doença periodontal e livres de lesões cariosas. Num estudo ultraestrutural subseqüente (Adriaens *et al,* 1988*)*, utilizando microscopia de luz e eletrônica de varredura para analisar 21 dentes humanos com doença periodontal avançada, o mesmo grupo de autores encontrou bactérias presentes no cemento, nos túbulos dentinários e até na polpa dental. Em dentes que foram instrumentados, observou-se a presença de bactérias no cemento dental remanescente. Os autores concluíram que estas bactérias poderiam servir como fonte de recolonização de sítios tratados periodontalmente, e, baseados nisto, propuseram a utilização de agentes químicos em associação à terapia mecânica.

Por outro lado, a extensão da contaminação do cemento dental tem sido bastante contestada, sendo motivo de muitas investigações na década de 80.

Jones & O´Leary (1978) testaram *in vivo* a efetividade da raspagem em remover endotoxinas bacterianas da superfície radicular de dentes periodontalmente comprometidos. As 48 superfícies instrumentadas continham, em média, somente 1ng a mais de endotoxinas que as superfícies de dentes saudáveis não-erupcionados, o que levou os autores a concluir que a raspagem foi capaz de produzir uma superfície radicular semelhante à de dentes saudáveis, quase totalmente livres de endotoxinas detectáveis.

Hughes & Smales (1986) descreveram o uso de um método imunohistoquímico para analisar a distribuição de endotoxinas no cemento radicular, em dentes expostos ao ambiente da bolsa periodontal. O grupo teste foi constituído por dentes humanos extraídos comprometidos por doença periodontal avançada, enquanto o grupo controle foi composto dentes extraídos por outras razões. Remanescentes de placa e cálculo foram removidos cuidadosamente da superfície radicular com curetas, sem a intenção de remoção do cemento. Todos os dentes comprometidos periodontalmente apresentaram reação positiva na superfície do cemento, indicando a presença de endotoxinas sobre a superfície cementária; os dentes do grupo controle não demonstraram nenhuma reação. Nas áreas mais profundas do cemento, não houve qualquer reação, sugerindo que a remoção exagerada de cemento pode não ser necessária para a obtenção de uma superfície

radicular livre de endotoxinas.

Moore *et al* (1986) analisaram a distribuição do lipopolissacarídeo (LPS) na superfície de dentes com doença periodontal, e verificaram que uma simples lavagem com água por 1 minuto foi capaz de remover 39% do LPS e a escovação por 1 minuto removeu 60% do LPS. Os achados de que 99% do LPS poderiam ser removidos com procedimentos conservadores levaram os autores a sugerir que a descontaminação da superfície radicular poderia ser atingida por outros métodos que não a tradicional raspagem e alisamento radicular.

Checchi & Pelliccione (1988) compararam instrumentos manuais e ultra-sônicos na remoção de endotoxinas da superfície radicular, em um estudo *in vitro*, utilizando dentes comprometidos periodontalmente, dentes com periodonto saudável, usados como controle, e alguns dos dentes com doença periodontal sem tratamento servindo como controle negativo. Após a imersão em cultura de fibroblastos, observou-se que ambos os métodos foram eficazes na remoção de endotoxinas da superfície radicular. Foram encontrados fibroblastos re-inseridos às raízes previamente doentes, após o mínimo de instrumentação com um aparelho ultra-sônico, removendo as endotoxinas sem remoção de cemento ou dentina e sem significante alteração da superfície radicular. Os autores concluíram que a instrumentação radicular deve ser racionalizada e que a remoção intencional de cemento é desnecessária, como já haviam afirmado Moore *et al* (1986).

Cheetham *et al* (1988) investigaram, através de análise LAL (limulus amoebocyte lysate) e cromatografia a quantidade residual de lipopolissacarídeos (LPS) após a instrumentação radicular *in vitro*. Uma abordagem conservadora foi utilizada, consistindo de apenas 15 movimentos de raspagem por superfície, evitando sobreposição, em 18 dentes unirradiculares com doença periodontal. A raspagem removeu quantidades variáveis de LPS e na maioria dos casos (72%) houve menos que 0,24ng de LPS residual por dente. Estes achados levaram os autores a defender a teoria de que uma raspagem excessiva talvez não seja necessária para remover endotoxinas.

Fukasawa & Nishimura (1994) realizaram um estudo *in vitro* investigando a eficácia de uma curetagem superficial do cemento na promoção de adesão celular em superfícies radiculares de dentes humanos. Foram utilizados 10 dentes com doença periodontal, dos quais cinco foram levemente instrumentados para a remoção apenas do cemento superficial, enquanto os outros cinco

não foram instrumentados. Os resultados mostraram que houve adesão de fibroblastos gengivais sobre as superfícies curetadas, mas o mesmo não ocorreu nas superfícies não instrumentadas. Os autores concluíram que a remoção superficial do cemento foi efetiva para promover adesão celular em superfícies previamente expostas à doença periodontal.

Okte *et al* (1999), num estudo *in vitro*, localizaram o LPS em apenas cinco dos 30 dentes com doença periodontal analisados, e a endotoxina estava localizada apenas superficialmente. Nenhum dos dentes apresentou LPS penetrando profundamente no cemento. Da mesma forma, Nakib *et al* (1982), estudando a penetração da endotoxina da *E. Coli* no cemento de dentes saudáveis e com doença periodontal, encontraram que as endotoxinas não penetram no interior do cemento, mas aderem fracamente à superfície radicular, podendo ser removidas com uma simples escovação por 1 minuto.

Carey & Daly (2001) avaliaram macroscopicamente e ultraestruturalmente o efeito da descontaminação subgengival de superfícies radiculares *in vivo* com a utilização de pincéis "micro-brush". Vinte e seis pacientes adultos, com 30 dentes indicados para extração por motivos periodontais, com pelo menos 30% de perda óssea, foram utilizados. Em cada dente, um sítio proximal foi descontaminado com a utilização do "micro-brush" por 2 minutos, enquanto o outro sítio proximal serviu como controle não tratado. Os dentes foram em seguida extraídos e corados com eritrosina a 2%. As superfícies coradas foram analisadas com microscopia eletrônica de varredura. As superfícies não tratadas exibiram-se 100% coradas, enquanto que as superfícies descontaminadas tiveram 16,1% de sua superfície corada. A análise microscópica revelou que as superfícies descontaminadas exibiram apenas "ilhas" de bactérias. Os autores concluíram que a descontaminação subgengival com microbrush foi efetiva na remoção de biofilme da superfície radicular de dentes periodontalmente comprometidos.

Cadosch *et al* (2003), investigando *in vitro* a associação entre o número de movimentos de raspagem e a redução de endotoxinas na superfície radicular, encontraram que após 9,3 movimentos de raspagem, em média, os níveis de endotoxinas atingiam um nível mínimo, compatível com níveis encontrados na saúde periodontal. Os autores comentaram que, após a remoção do cálculo, não seria necessário realizar uma raspagem adicional para a remoção do cemento ou da dentina.

Outras modalidades terapêuticas também foram investigadas quanto ao padrão de remoção

de endotoxinas da superfície radicular. A irradiação *in vitro* com laser de neodímio (Liu *et al*, 2002) não foi capaz de eliminar endotoxinas extraídas do cemento de dentes com doença periodontal, mas a aplicação de tetraciclina (Shapira *et al*, 1996) parece neutralizar parcialmente estas endotoxinas.

Lindhe & Nyman (1984) sugerem que o determinante crítico da terapia periodontal não é a escolha da modalidade de tratamento, mas a descontaminação da superfície radicular e o padrão de higiene bucal do paciente. Está devidamente estabelecido que a inflamação e infecção periodontais podem ser controladas por métodos cirúrgicos ou não cirúrgicos e a manutenção da saúde dos tecidos periodontais pode ser sustentada em longo prazo com um bom controle de biofilme diário pelo paciente e manutenção profissional periódica pelo dentista ou higienista (Kaldahl *et al*, 1994).

2.4 – Padrões de remoção do cemento dental

A raspagem e alisamento radicular com curetas, com instrumentos sônicos e ultra-sônicos são os procedimentos mais freqüentemente utilizados para o tratamento da doença periodontal. Entretanto, vários autores têm demonstrado que estes procedimentos resultam em padrões pouco previsíveis de remoção de cemento dental e, inclusive, de depósitos de cálculo sobre a superfície radicular.

O´Leary & Kafrawy (1983) realizaram um estudo *in vivo* com o objetivo de determinar se a remoção total do cemento dental poderia ser alcançada clinicamente. Neste estudo, 36 dentes com periodontite (perda de inserção de no mínimo 6mm), indicados para extração, foram instrumentados com 50 movimentos de raspagem, utilizando 3 diferentes tipos de curetas. Em seguida, os dentes foram extraídos e preparados para análise histológica. Dois dentes foram excluídos da amostra devido à orientação inadequada dos cortes. Nenhum dos demais 34 dentes teve o cemento totalmente removido da superfície radicular, e não houve diferenças aparentes quanto ao padrão de remoção entre os diferentes tipos de curetas. Grandes quantidades de cemento residual foram encontradas nas regiões mais apicais. Os autores concluíram que a remoção total do cemento durante a raspagem não é um objetivo clínico real. Estes achados foram sustentados por Coldiron *et al* (1990), que encontraram fragmentos de cemento mesmo após 70 movimentos de raspagem *in vitro*, em dentes com periodonto saudável. Num estudo subseqüente com metodologia semelhante, o mesmo grupo de autores (Kepic *et al*, 1990) verificou que nem mesmo a remoção total do cálculo das superfícies radiculares de dentes com doença periodontal foi possível, seja com instrumentos

ultra-sônicos ou manuais. Anteriormente, foi demonstrado que depósitos de cálculo residual permaneciam sobre as superfícies instrumentadas com ultrassom ou curetas mesmo após a abertura de um retalho total para melhor acesso (Hunter *et al*, 1984).

Os efeitos da raspagem e alisamento radicular e da remoção de tecido dental sobre a polpa também tem sido objeto de investigação por alguns autores.

Wallace & Bissada (1990) avaliaram clinicamente a sensibilidade dental após terapia periodontal, utilizando testes térmico (frio e jato de ar) e elétrico. Os autores verificaram que a terapia periodontal, especialmente a terapia cirúrgica associada à retração gengival no pós-operatório, está associada a maiores níveis de sensibilidade dental.

Bergerholtz & Lindhe (1978), estudando o efeito da periodontite induzida por ligaduras sobre a polpa dental de macacos, encontraram alterações histológicas inflamatórias leves na polpa de 57% dos dentes com doença periodontal. Dentes submetidos à raspagem e alisamento radicular previamente ao acúmulo de biofilme não exibiram agravamento ou aumento da incidência das reações inflamatórias na polpa. Os autores concluíram que nem a destruição periodontal nem a raspagem são capazes de causar alterações pulpares severas, apesar de existirem reações inflamatórias de caráter leve.

Ryan *et al* (1984) estudaram histologicamente, em modelo felino (gatos), a resposta pulpar à raspagem e à aplicação de ácido cítrico sobre a superfície radicular. Os autores encontraram, após a raspagem, reações pulpares inflamatórias de leve a moderada em um período curto de avaliação (4 e 21 dias), e reação leve ou inexistente em um período longo de avaliação (83 dias). A aplicação subseqüente de ácido cítrico resultou, em 28% dos casos, em abscesso ou necrose pulpar após 83 dias.

Na tentativa de estabelecer abordagens mais conservadoras de descontaminação radicular, evitando a remoção intencional excessiva do cemento, Kocher *et al* (2001) desenvolveram pontas sônicas revestidas de teflon, capazes de remover placa sem remover substância dental, com o objetivo de realizar um "polimento" subgengival. Os autores demonstraram a efetividade clínica destas pontas no retratamento de bolsas periodontais já instrumentadas com curetas, onde a remoção adicional de substância dental parece ser crítica, sugerindo a escolha das mesmas para utilização na terapia de manutenção, em bolsas residuais.

Anteriormente, Smart *et al* (1990) já haviam investigado, *in vitro*, o efeito de um regime

conservador de descontaminação radicular com ultra-som na remoção de LPS de dentes com doença periodontal. Foram utilizados 20 dentes unirradiculares extraídos, que foram descontaminados com uma ponta de ultrassom (Cavitron TF-10), com pressão leve (50g) e sem sobre-instrumentar a mesma superfície (0,8 segundos/mm^2). Os níveis de LPS encontrados após esta abordagem (menos que 2,5 ng por superfície) foram comparáveis àqueles encontrados em dentes saudáveis. Os autores concluíram que uma instrumentação excessiva não é necessária para remover endotoxinas da superfície radicular, e propuseram a utilização de um regime mais conservador de descontaminação radicular.

2.5 – Regeneração dos tecidos periodontais e do cemento dental

O princípio biológico da regeneração tecidual guiada foi proposto visando a regeneração periodontal (formação de novo cemento, novo osso e novo ligamento periodontal). Este princípio baseia-se na capacidade dos diferentes tecidos periodontais em promover a regeneração, e foi estabelecido ao longo de uma série de estudos que avaliaram a participação destes tecidos no processo de cura (Nyman *et al*, 1980; Karring *et al*, 1980). Sua base racional surgiu dos postulados de Melcher (1976), o qual estabeleceu que as células capazes de neoformar as estruturas de sustentação dental eram as células do ligamento periodontal. Ainda não existem dados conclusivos sobre o papel do cemento na regeneração dos tecidos periodontais.

Embora a extensão da injúria e a quantidade de tecido perdido sejam fatores determinantes importantes, um tecido danificado irá cicatrizar por regeneração ou reparo dependendo de dois fatores cruciais: a disponibilidade dos tipos celulares adequados e a presença ou ausência de fatores sinalizadores necessários para o recrutamento e estimulação destas células. No caso da regeneração do cemento dental, as células requeridas são os cementoblastos, entretanto, a origem dos cementoblastos e os fatores que regulam seu recrutamento e diferenciação ainda não estão completamente entendidos. Modelos *in vivo* para avaliar o padrão de expressão de moléculas específicas durante a cementogênese e estudos *in vitro* sobre os efeitos de componentes do cemento em diferentes tipos celulares periodontais tem sido desenvolvidos para melhor investigar como os componentes do cemento poderiam regular a regeneração deste tecido (Saygin *et al*, 2000). Estes estudos podem gerar informações úteis para o desenvolvimento de novas técnicas e abordagens na terapia periodontal regenerativa.

Nos últimos anos, muito se tem pesquisado sobre o mecanismo de regeneração e reparação

tecidual. Uma das estratégias tem sido a identificação de fatores que interferem nesse processo e na modulação da resposta tecidual seja por meio da adição de células, materiais e fatores de crescimento (Giannobile, 1996).

Os fatores de crescimento desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e crescimento dos tecidos, além de participarem na dinâmica do remodelamento (McCauley & Sommerman, 1998). Dentre esses fatores estão o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF-I e -II), Fator de Crescimento Transformador (TGF-α e -β), Fator de Crescimento dos Fibroblastos (FGF ácido e básico), Fator de Crescimento Epidermal (EGF), entre outros (McCauley & Sommerman, 1998). Tais fatores são proteínas sinalizadoras sintetizadas com o objetivo de modular a cicatrização normal de uma forma ordenada, estimulando e regulando o processo de cicatrização tecidual. São produzidos por uma grande variedade de células e podem estimular a quimiotaxia, proliferação e função secretora tanto de maneira autócrina (estimulando a célula responsável pela sua síntese) quanto parácrina (estimulando células próximas às células responsáveis pela sua síntese) (McCauley & Sommerman, 1998). Devido a esta capacidade de regular o processo de cura, a sua utilização pode ter alguma implicação clínica (Koveker, 2000).

Com o objetivo de esclarecer alguns eventos biológicos que ocorrem durante a regeneração periodontal, Ivanovski *et al* (2000), investigaram imunohistoquimicamente a expressão de componentes da matriz extracelular associadas à regeneração tecidual guiada. Para isso, foram utilizados defeitos periodontais criados cirurgicamente nos segundos pré-molares inferiores de quatro cães, tratados com raspagem e alisamento radiculares e com o uso de membranas não-reabsorvíveis. Após um período de cicatrização de quatro semanas, os autores encontraram colágeno do tipo I localizado principalmente no osso neoformado, enquanto que o colágeno tipo III era mais abundante nos tecidos moles preenchendo o defeito. Proteoglicanas (decorina e biglicana) não foram encontradas na matriz extracelular, mas exibiram intensa marcação intracelular próxima ao cemento em regeneração e também no osso. A marcação para BMP-2 e BMP-4 foi fraca no osso, mas forte na matriz extracelular dos tecidos moles regenerados. Osteopontina (OPN) e sialoproteína óssea (BSP) foram fortemente localizadas no osso e no cemento em regeneração. Osteocalcina (OCN) foi localizada no cemento maduro, no cemento em regeneração e fortemente associada aos cementoblastos, embora tenha apresentado marcação fraca no osso em regeneração comparada à

do osso maduro. Os autores concluíram que a distribuição de OCN, OPN e BSP, em particular, indicam a presença de atividade osteogênica e cementogênica, essencial para a regeneração periodontal. Segundo os autores, o padrão de imunolocalização heterogênea observada nos tecidos neoformados após RTG evidencia a dificuldade em manipular populações celulares diversas, de maneira coordenada, para atingir regeneração periodontal, de modo previsível.

Amar *et al* (1997), num estudo imunohistoquímico, investigaram as moléculas associadas com tecidos formados após RTG em macacos *Rhesus*, comparados a tecidos controles sem RTG. Os autores encontraram marcação para osteonectina na matriz extracelular dos tecidos neoformados, particularmente no tecido conjuntivo adjacente ao novo osso e nas fibras conjuntivas. Uma intensa marcação para sialoproteína óssea também foi encontrada no tecido conjuntivo adjacente ao novo osso no grupo teste e não no controle, e a proteína de adesão do cemento (CAP) foi localizada nos tecidos após RTG, mas não no controle. Os autores concluíram que os tecidos formados sob condições de RTG contêm células e macromoléculas normalmente associadas com a formação de osso e cemento. Num estudo bastante semelhante em cães, Matsuura *et al* (1995) encontraram que a fibronectina e a vitronectina estavam associadas nas fases precoces do reparo, e que a regeneração periodontal estava associada com componentes da matriz específicos para os diferentes tipos de tecido periodontal, com marcação para osteopontina e sialoproteína óssea na fase de formação de tecidos mineralizados.

Lerner (2004), em um trabalho de revisão, estudou algumas moléculas encontradas no ligamento periodontal, polpa dental e odontoblastos, e estas podem agir na formação e ativação dos osteoclastos. Dentre estas moléculas estão os três membros do fator de necrose tumoral e a superfamília de receptores (RANK- "receptor activator of NF-kβ", RANKL -"receptor activator of NF-kβ ligand" e OPG - osteoprotegerina). A expressão de RANKL e OPG é regularmente encontrada em pacientes saudáveis fazendo parte do processo de regulação da remodelação óssea, através da interação osteoclasto e osteoblasto (Theoleyre, *et al*., 2004). Estudos afirmam que o RANKL está diretamente relacionado ao processo de reabsorção óssea (Teitebaum 2000), e este é bloqueado pela ação da OPG, que leva a uma diminuição da perda óssea alveolar (Teng *et al*., 2000, Liu *et al*., 2003), tornando o OPG uma molécula protetora da massa óssea. Estes genes podem ser inibidos ou estimulados por inúmeras outras como IL-1, TNF -α ,TGF-β que podem agir diretamente em células ósseas ou através da ativação via osteoclastos, sendo esta via considerada a chave da regulação do

processo de reabsorção/ aposição óssea.

Numa revisão sobre a cicatrização periodontal e a regeneração do cemento dental, Grzesik & Narayanan (2002) chamaram a atenção para a matriz extracelular do cemento, cuja composição é similar a matriz de outros tecidos mineralizados, mas com características fisiológicas únicas. A matriz do cemento dental contém moléculas não detectáveis em outros tecidos, que influenciam a atividade de vários tipos celulares. A matriz orgânica do cemento é composta primariamente de colágeno (90% de colágeno tipo I e 5% de colágeno tipo III). Duas proteínas não colagenosas (osteopontina e sialoproteína óssea), constituintes da matriz, parecem exercer um papel importante na diferenciação de células progenitoras em cementoblastos (Saygin *et al*, 2000). Outros fatores de crescimento com habilidade de promover proliferação e diferenciação de células cementoprogentitoras, como BMP-2, -3 e -4, PDGF-β, TGF-β e IGF-I, também estão presentes na matriz do cemento. Muitos destes componentes também estão presentes no osso, entretanto alguns autores descreveram moléculas que parecem ser exclusivas do cemento dental. Uma delas é uma molécula semelhante à IGF-I, porém com maior peso molecular, denominada fator de crescimento do cemento (CGF) (Ikezawa *et al*, 1997). Arzate *et al* (1992) descreveram a proteína de adesão do cemento (CAP), uma proteína colagenosa. Anticorpos para a CAP marcam somente o cemento, e não outros componentes do periodonto ou outros tecidos investigados. Posteriormente Alvarez-Pérez *et al* (2005,) em um estudo in vitro, identificou um outro marcador específico para o cemento dental chamado CP-23 (proteína do cemento). Hara *et al* (2005) desenvolveram um anticorpo monoclonal para a junção cemento-ligamento periodontal associado à regeneração periodontal, denominado anti-TAPmAb, e examinaram suas características imunohistoquímicas e antigênicas. Este anticorpo foi encontrado com marcação positiva na junção cemento-ligamento periodontal e na pré-dentina humana, mas negativa em todos os outros tecidos humanos e animais examinados. Em lesões cemento-ossificantes, o anti-TAPmAb foi encontrado na periferia do cemento e tecidos semelhantes a cemento, mas não no osso. Estas moléculas específicas do cemento podem ser úteis no estudo da cementogênese e regeneração do cemento dental.

Estudos histológicos em modelo animal têm demonstrado diferentes níveis de formação de novo cemento dental, dependendo da modalidade terapêutica empregada.

Num estudo detalhando aspectos ultraestruturais dos tecidos periodontais formados após RTG, em cães, utilizando microscopia de luz, eletrônica de varredura e eletrônica de transmissão, os

autores observaram que regeneração periodontal (formação de novo cemento, ligamento periodontal com fibras colágenas funcionalmente orientadas e formação de novo osso) ocorreu somente em partes da superfície radicular onde havia cemento remanescente após a raspagem dental. Nova inserção ocorreu sobre áreas de novo cemento e de dentina periférica (Schüpbach *et al*, 1993).

Blömlof *et al* (1987) realizaram um estudo em macacos, com o objetivo de comparar o reparo periodontal e a quantidade de nova inserção com ou sem a remoção do cemento dental. Os autores utilizaram o modelo de indução de periodontite experimental utilizando ligaduras de elástico ortodôntico por seis meses, que foram capazes de produzir lesões severas de bifurcação nos segundo pré-molares, primeiros e segundos molares inferiores. A formação de novo osso e novo cemento foi avaliada através de marcação com tetraciclina. Nova inserção não foi observada após a raspagem com instrumentos manuais ou ultra-sônicos, que resultou na formação de epitélio juncional longo; entretanto, a limpeza da superfície radicular com dois detergentes (cloreto de cetilpiridíneo e N-lauril-sarcosina), sem a realização de raspagem e alisamento radicular, resultou numa quantidade significante de nova inserção.

Nyman *et al* (1986) realizaram um estudo em cães, com o objetivo de investigar se a descontaminação da superfície radicular deveria incluir a remoção do cemento dental para se obter saúde periodontal. Para isso, foram utilizados cinco cães, que receberam ligaduras de fio de algodão nos segundos, terceiros e quartos pré-molares inferiores, por quatro meses, até que a perda óssea atingisse metade do comprimento radicular. Dois meses após a remoção das ligaduras, num desenho de boca dividida, os animais receberam raspagem e alisamento radicular com curetas e brocas e acesso cirúrgico de um lado da mandíbula, enquanto o outro lado recebeu apenas polimento dental com taças de borracha e pasta profilática, após o acesso cirúrgico. Os animais foram mantidos com um rigoroso controle de placa, e dois meses após o tratamento foram sacrificados para avaliação histométrica. Os dados histométricos mostraram que o resultado da cicatrização foi similar nos dois grupos, com a formação de epitélio juncional longo adjacente a um tecido conjuntivo não inflamado. Nas partes mais apicais dos defeitos houve a formação de nova inserção, independente do tipo de tratamento. Os autores sugeriram que a remoção do cemento dental com o objetivo de eliminar endotoxinas da superfície radicular não é necessária para a obtenção de saúde periodontal.

Gonçalves *et al*, 2006 avaliaram, histometricamente em cães, o potencial regenerativo do

cemento em lesões de bifurcação classe III tratadas pelo princípio da regeneração tecidual guiada (RTG). No grupo controle, após o levantamento de retalhos mucoperiosteais por vestibular e lingual, o defeito foi instrumentado, incluindo a remoção do tecido de granulação e uma cuidadosa raspagem e alisamento radicular, utilizando curetas e pontas diamantadas de granulação fina em baixa rotação. E em seguida, as superfícies radiculares foram polidas com taças de borracha e pasta para polimento, objetivando a remoção dos depósitos duros e moles e do cemento radicular. No grupo teste, após o levantamento de retalhos mucoperiosteais por vestibular e lingual, os defeitos foram instrumentados, incluindo somente a remoção do tecido de granulação e polimento radicular com escovas, taças e pontas interdentais de borracha e pasta profilática, objetivando a remoção somente dos depósitos moles sobre as raízes e preservando o cemento radicular. Após 4 meses de rigoroso controle de placa os animais foram sacrificados. Os autores puderam concluir que no grupo onde o cemento dental foi mantido encontrou-se uma maior porcentagem de novo cemento e novo osso levando os autores a concluir que o cemento dental pode modular a regeneração periodontal obtida em defeitos de furca III em cães tratados com RTG.

Num estudo clínico em humanos, Nyman *et al* (1988), incluíram 11 pacientes adultos com doença periodontal de moderada a avançada. Num desenho de boca dividida, quadrantes controle foram raspados com curetas e brocas com acesso cirúrgico e quadrantes testes foram tratados apenas com polimento dental com taças de borracha e pasta profilática. Os depósitos de cálculo no grupo teste foram destacados com o uso de curetas não afiadas, com o cuidado de não remover o cemento dental. Os pacientes foram mantidos sob um rígido controle de placa, inicialmente incluindo profilaxia profissional a cada 15 dias, por 3 meses e re-chamadas a cada 3 meses para controle de placa a partir de então, até o fim do estudo (24 meses). Os resultados mostraram que o mesmo grau de melhora da saúde periodontal foi atingido após os dois tipos de tratamento. Uma baixa freqüência de sítios com sangramento a sondagem e uma alta freqüência de sítios com bolsas rasas foram alcançadas em todos os quadrantes. Entre o exame inicial (baseline) e os exames subseqüentes (6, 12 e 24 meses) houve ganho no nível clinico de inserção para ambos os grupos. Este ganho foi mais pronunciado nas bolsas inicialmente mais profundas e similar para as duas modalidades de tratamento. Os autores concluíram que a remoção intencional excessiva do cemento dental, com o objetivo de eliminar endotoxinas, parece não estar justificada.

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil de expressão gênica do tecido de granulação formado em defeitos infraósseos tratados pelo princípio da RTG na presença ou não de cemento dental. Para isso foi avaliado quantitativamente os níveis de RNAm para os seguintes genes: fosfatase alcalina (ALP), "receptor activator of NF-kβ ligand" (RANKL), osteocalcina (OCN), osteopontina (OPN), sialoproteína óssea (BSP), proteína morfogenética óssea (BMP)-2 e 3, fator de crescimento derivado de insulina (IGF-1), Colágeno tipo I e III, metaloproteinase (MMP)-2 e -9, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)-1, fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF), fator de crescimento transformador beta (TGF-β), osteoprotegerina (OPG) e interleucina (IL)-1ß, IL-4 e IL-6por meio da técnica de PCR quantitativo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção da amostra:

Foram selecionados 30 pacientes, que apresentaram dentes nas regiões anteriores ou posteriores, com defeitos infraósseos profundos, ≥ 5 mm, (2 ou 3 paredes) e indicados para extração. Todos os procedimentos foram executados conforme as normas éticas aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Humana (CEP) da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP segundo resolução CNS 196/96 **(Anexo 1)**.

De acordo com os critérios de inclusão estabelecidos, participaram do estudo pacientes adultos, de 29 a 59 anos, dentados ou parcialmente edêntulos, portadores de periodontite crônica. Os pacientes não poderiam apresentar evidências de modificadores sistêmicos da doença periodontal (osteoporose, fumo, diabetes e uso de medicamentos que influenciam os tecidos periodontais). Neste pacientes, foram selecionados dentes indicados para extração, portadores de defeitos com componente infraósseo profundo (≥ 5 mm), ausência de tratamento endodôntico, ausência de cárie radicular e sem restaurações próximas à margem gengival.

Foram excluídas da amostra mulheres grávidas ou lactantes, indivíduos que tenham tomado ou estejam tomando antibióticos, antiinflamatórios ou terapia hormonal, e/ou que tenham recebido tratamento periodontal nos últimos seis meses anteriores à pesquisa. Para o grupo teste (preservação do cemento dental) os pacientes não poderiam ter sido submetidos a tratamento periodontal prévio. Foram ainda excluídos os pacientes que não estiveram de acordo com o consentimento formal para a participação na pesquisa, após a explicação dos riscos e benefícios por indivíduo não envolvido na mesma. (Resolução nº 196 de outubro de 1996 e o Código de Ética Profissional Odontológico (C.F.O.) 179/93).

4.2 Delineamento do estudo:

O estudo realizado foi do tipo transversal, envolvendo 30 pacientes, que foram divididos em dois grupos experimentais, de acordo com seu histórico de terapia periodontal prévia ou não (raspagem e alisamento radicular).

Grupo 1 (controle): 15 pacientes, onde foi realizada a remoção do tecido de granulação, raspagem e alisamento radicular, utilizando curetas e pontas diamantadas em baixa rotação, objetivando a remoção dos depósitos duros e moles e do cemento dental, por fim descontaminação radicular com micro escovas e soro fisiológico.

Grupo 2 (teste): 15 pacientes, onde foi realizada a remoção do tecido de granulação, os depósitos de cálculo existentes foram somente destacados com curetas, sem a realização do movimento de raspagem e descontaminação radicular, por meio de micro escovas e soro fisiológico, objetivando a máxima preservação do cemento dental.

2.3 Procedimentos cirúrgicos:

A área cirúrgica foi localmente anestesiada com lidocaína 2% (Merrel Lepetit Farmacêutica Ltda, Santo Amaro, SP, Brasil), contendo epinefrina (1: 50.000), com o objetivo de reduzir a hemorragia e assegurar um efeito anestésico adequado. De acordo com cada grupo, teste ou controle, foram realizados os seguintes tratamentos:

(Controle) Após o levantamento de retalhos mucoperiosteais por vestibular e lingual, os defeitos foram instrumentados, incluindo a remoção do tecido de granulação e uma cuidadosa raspagem e alisamento radicular, utilizando curetas e pontas diamantadas em baixa rotação, objetivando a remoção dos depósitos duros e moles e do cemento dental, por fim descontaminação radicular com micro escovas e soro fisiológico **(Figura 1);**

(Teste) Levantados os retalhos mucoperiosteais por vestibular e lingual, os defeitos foram instrumentados, incluindo a remoção do tecido de granulação e descontaminação radicular com micro escovas e soro fisiológico, objetivando a remoção dos depósitos moles sobre as raízes e preservando o cemento dental. Os depósitos de cálculo existentes foram somente destacados com curetas, sem a realização do movimento de raspagem **(Figura 2**).

Após os diferentes tipos de abordagem da superfície radicular exposta à doença, todos os

defeitos foram tratados com o princípio da RTG, utilizando membranas não reabsorvíveis de politetrafluoretileno expandido (Regenerative Material, Gore-tex, Gore Associates, Flagstaff, AZ, USA), cobrindo totalmente o defeito e se estendendo sobre o osso adjacente, cerca de 2 a 3 mm. Em todos os sítios, os retalhos foram posicionados coronariamente (1 a 2 mm em direção coronal) e suturados (suturas suspensórias e interrrompidas) com fio de PTFE-e (Gore-Tex sutures, WL, Gore, Flagstaff, AZ, EUA). Os pacientes receberam antibioticoterapia com amoxicilina 500mg de 8 em 8 horas durante 7 dias após a cirurgia e para controle da dor foi prescrito dipirona sódica 500mg de 4 em 4 horas, por 48 horas. O controle do biofilme dental no pós-operatório foi feito com bochechos de digluconato de clorexidina a 0,12%, por um período de 21 dias, juntamente a aplicação tópica de digluconato de clorexidina a 1% em forma de gel. As suturas foram removidas após 7 a 10 dias. Três semanas após a cirurgia de tratamento dos defeitos a membrana foi removida, o tecido neoformado sob a membrana dentro do defeito, foi cuidadosamente coletado, o dente extraído e acondicionado em formol e o retalho suturado. O pós-operatório da cirurgia de exodontia foi acompanhado normalmente **(Figura 1 e 2)**.

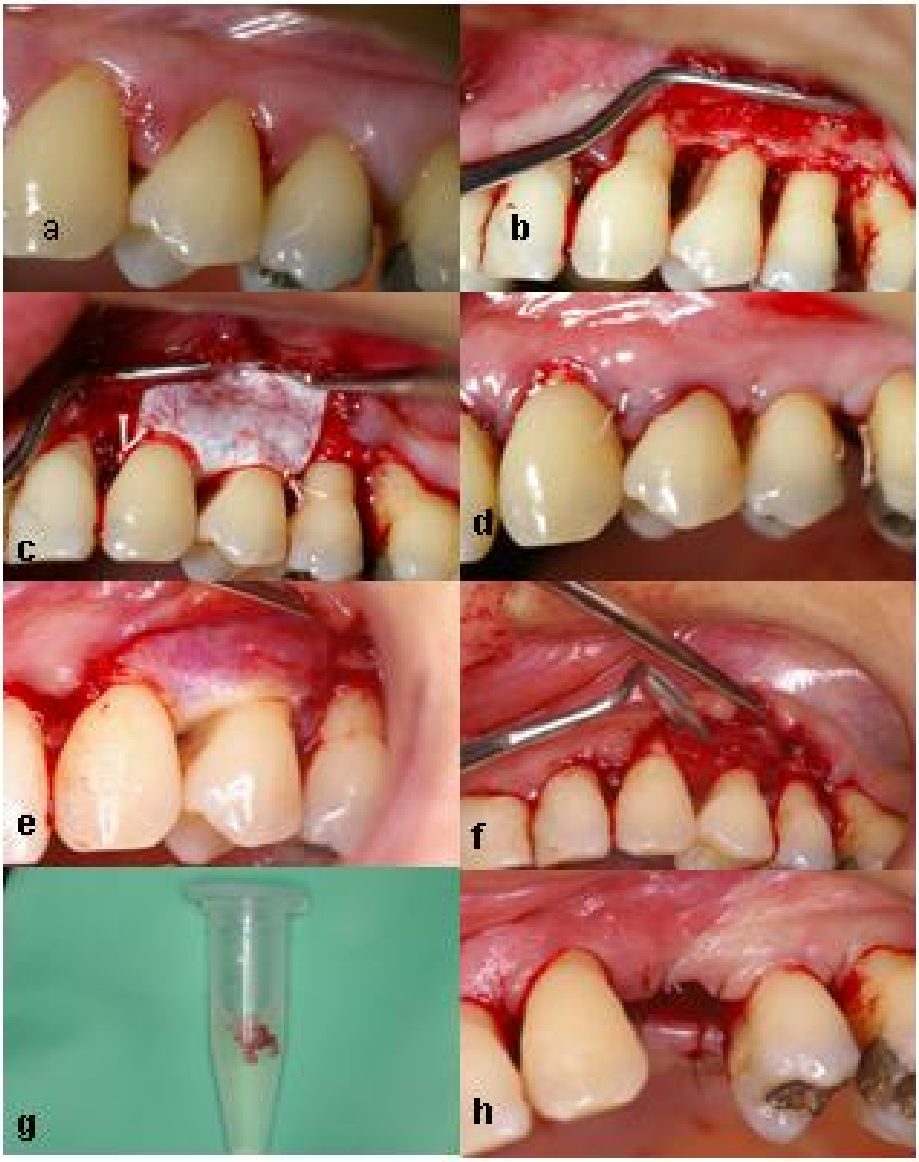


Figura 1: Fotografias clínicas ilustrativas da seqüência de procedimentos realizados para tratamento da superfície radicular dos dentes selecionados para o grupo controle. Após a seleção do defeito, foi realizado o levantamento do retalho mucoperiosteal na região do dente 24 (a), seguido pela raspagem e aplainamento da superfície radicular (b), com posterior colocação da membrana de PTFE-e (c), reposicionamento do retalho e sutura (d).Após 21 dias da cirurgia de tratamento do defeito a membrana foi removida (e),o tecido de granulação formado sob a membrana foi cuidadosamente removido (f) e acondicionado em tubos "eppendorf" contendo uma solução para evitar a degradação do RNA (RNAlater®, Ambion Inc., Austin, TX) (g),o dente extraído e o retalho suturado (h).

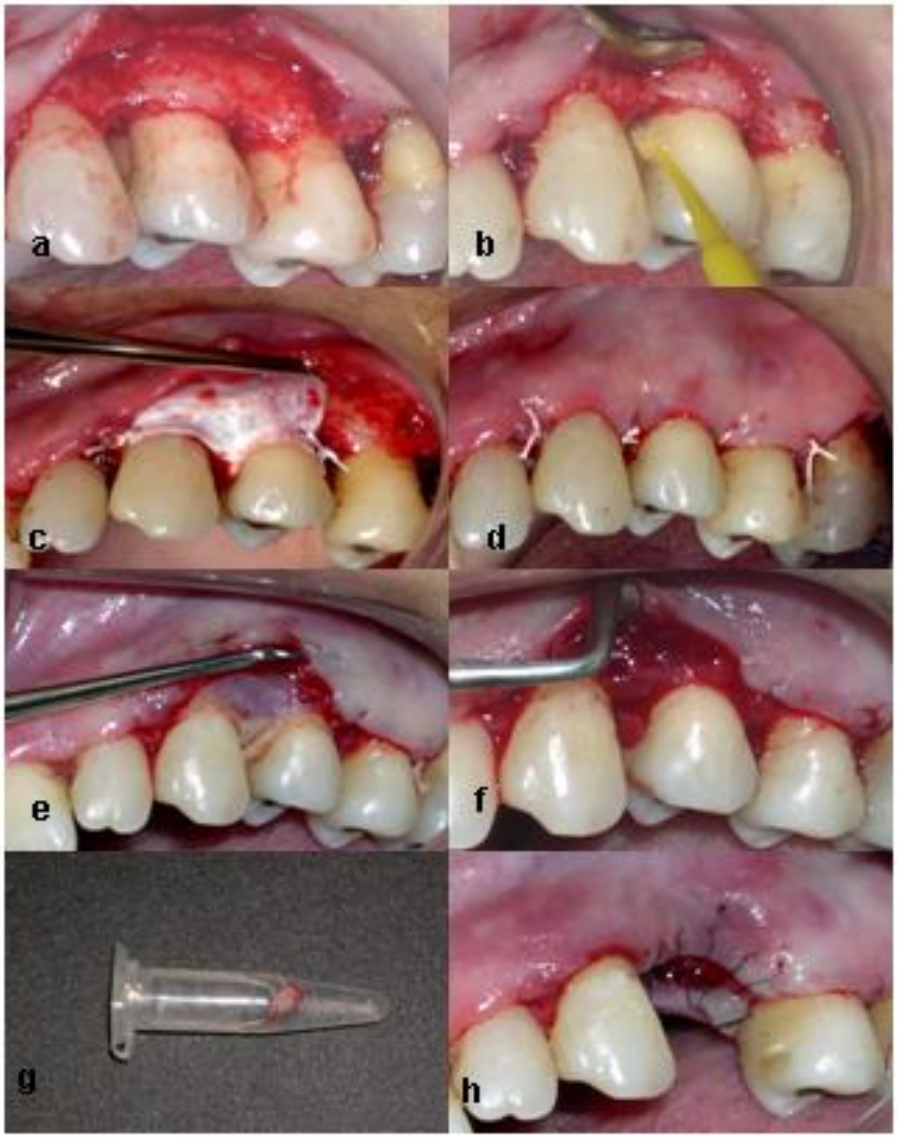


Figura 2: Fotografias clínicas ilustrativas da seqüência de procedimentos realizados para tratamento da superfície radicular dos dentes selecionados para o grupo teste. Após a seleção do defeito foi realizado o levantamento do retalho mucoperiosteal na região do dente 24 (a), seguido pela utilização de microescovas para descontaminação da superfície radicular (b), com posterior colocação da membrana de PTFE-e (c), reposicionamento do retalho e sutura (d). Após 21 dias da cirurgia de tratamento do defeito, a membrana foi removida (e), o tecido de granulação formado sob a membrana foi cuidadosamente removido (f) e acondicionado em tubos "eppendorf" contendo uma solução para evitar a degradação do RNA (RNAlater®, Ambion Inc., Austin, TX) (g), o dente extraído e o retalho suturado (h).

4.4 Extração do RNA:

Logo antes da execução da exodontia, após a remoção da barreira, o tecido de granulação

contido no defeito em cicatrização foi cuidadosamente removido e transportado para o laboratório acondicionado em tubos "eppendorf" contendo uma solução para evitar a degradação do RNA (RNAlater® , Ambion Inc., Austin, TX). Os tecidos acondicionados em RNAlater® foram mantidos a uma temperatura de 4ºC - 8ºC por um período de 12 horas e então foram transferidos para -70ºC até seu processamento. O RNA total foi então extraído da amostra pelo método do reagente TRIZOL® seguindo as recomendações do fabricante, descritas brevemente como se segue: a solução de RNAlater® foi aspirada, o tecido macerado em nitrogênio líquido, e 1ml de reagente TRIZOL® adicionado ao tubo com a amostra, agitado por 30 segundos e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, 0,2 mL de clorofórmio (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi adicionado ao tubo, agitado (vórtex) e centrifugado (10.000 rpm por 15 minutos a 4ºC). A porção aquosa foi transferida para um outro tubo ao qual foi adicionado 0,5 mL de isopropanol, agitado, incubado por 20 minutos a uma temperatura de –20ºC e centrifugado da mesma forma que descrito acima. O "pellet" foi lavado com etanol gelado a 75% e seco em temperatura ambiente. As amostras de RNA foram então resuspensas em 30 μL de água livre de RNase (tratada com dietilpirocarbonato -DEPC) e armazenadas a –70ºC. A concentração de RNA foi determinada com a utilização de um espectrofotômetro (Eppendorf AG, Hamburg, Germany).

2.5 Transcrição reversa:

O RNA total foi tratado para a eliminação de qualquer resíduo de DNA na amostra (DNA-free™, Ambion Inc., Austin, TX, USA), e 1μg da amostra foi utilizado para a síntese de cDNA (DNA complementar). Para isto, as reações foram realizadas utilizando-se o kit "first-strand cDNA synthesis (Roche Diagnostic Co., Indianapolis, IN, USA), seguindo as recomendações do fabricante para um volume final de 20 μL. As amostras foram incubadas por 10 minutos a 25ºC e então por 60 minutos a 42ºC. Concluído o segundo ciclo de incubação, as amostras foram incubadas por 5 minutos a 99ºC e então incubadas por 5 minutos a 4 ºC para resfriamento. Os reagentes utilizados e suas respectivas concentrações foram: solução tampão (1x), $MgCl_2$ (5mM), mistura de deoxinucleotídeos (1mM), "*primers"* randomizados - $p[dN]_6$ (3,2μg), inibidor de Rnase (50U), e trancriptase reversa – AMV (20U).

2.6 Desenho *dos "Primers":*

Os *"primers"* para GAPDH (gene de referência), fosfatase alcalina (ALP), "receptor activator

of NF-kβ ligand" (RANKL), osteocalcina (OCN), osteopontina (OPN), sialoproteína óssea (BSP), proteína morfogenética óssea (BMP)-2 e 3, fator de crescimento derivado de insulina (IGF-1), Colágeno tipo I e III, metaloproteinase (MMP)-2 e -9, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)-1, fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF), fator de crescimento transformador beta (TGF-β), osteoprotegerina (OPG) e interleucina (IL)-1ß, IL-4 e IL-6 já foram desenhados com o auxílio de um programa desenvolvido especificamente para desenhar *"primers"* para o LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) (Tabela 1). Todos os *"primers"* foram verificados quanto a sua especificidade através da verificação da curva de Melting (obtida após a corrida no LightCycler).

Tabela 1: Seqüência dos primers desenhados e as respectivas Tm´s.

Gene	Primer	Tm (°C)

GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC GAAGATGGTGATGGGATTTC	53,6 51,4
Colágeno I	CCCTGGTGCTACTGGTT ACCACGCTGTCCAGCAATA	60,1 60,4
Colágeno III	CCTGGTGGTAAAGGAGAAAGAG GACCAGGAAGACCACGAG	59,9 60,2
MMP-2	CGACCGCGACAAGAAGTA GCACACCACATCTTTCCGTCA	60,2 60,4
MMP-9	CAGTTTCCATTCATCTTCCAAGG CCCATCACCGTCGAGTC	59,9 60,2
OCN	AGCTCAATCCGGACTGT GGAAGAGGAAAGAAGGGTGC	60,4 60,8
OPN	AAAGCCAATGATGAGAGCAA ATTTCAGGTGTTTATCTTCTTCCTTAC	59,6 60,0
OPG	CAAAGTAAACGCAGAGAGTGTAGA GAAGGTGAGGTTAGCATGTCC	59,9 59,6
RANKL	CGACATCCCATCTGGTTCC GCTGGTTTTAGTGACGTACACC	56,5 56,0
IL-1	CTTCTTCGACACATGGGATAAC TTTGGGATCTACACTCTCCAGC	60,3 60,6
IL-6	CTAGAGTACCTCCAGAACAGATTTGA TCAGCAGGCTGGCATTT	60,2 60,9
IL-4	GTTGACCGTAACAGACATCTTTG CGAGCCGTTTCAGGAATC	60.2 59.9
ALP	CGGGCACCATGAAGGAAA GGCCAGACCAAAGATAGAGTT	60,1 60,4
BMP-2	TCAGCATGTTCGGCCTGAAA AAAGATTCTTCATGGTGGAAGC	59,7 59,9
BMP-3	TGGCTGTCTAAAGATATCACTCAATTC GCGGCATCATTGGCATATAC	60,0 60,0
TGF-ß	TACAACAGCACCCGCGA TATATATGCTGTGTGTACTCTGCTTGA	59,6 60,0
PDGF	GGGAAGGCCTAGGGAGT ACATAGTAGGTTCAGGAATGTAACAC	60,6 59,9

GAPDH: *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (gene de referência), **ALP**: fosfatase alcalina; **RANKL**: "receptor activator of NF-kβ ligand"; **OCN**: osteocalcina; **OPN**: osteopontina; **MMP**: metaloproteinase; **PDGF**: fator de crescimento derivado de plaquetas; **OPG**: osteoprotegerina; **IL**: interleucina; **BMP** : proteína óssea morfogenética; **TGF-ß**: Fator de crescimento transformador beta.

4.7 Otimização das reações:

A eficiência das reações para cada *"primer"* foi otimizada anteriormente ao início das reações propriamente ditas. Concentrações variando de 2 a 5 mM de $MgCl_2$ e de 0,2 a 0,5μM de

cada *"primer" foram* utilizadas para se determinar em quais condições a reação teria a melhor eficiência. Condições essas sugeridas pelo fabricante do equipamento.

4.8 Reações de Real Time-PCR:

As reações de PCR quantitativo foram realizadas com o sistema LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), utilizando-se o kit "FastStart DNA Master SYBR Green I" (Roche Diagnostic Co). O perfil das reações foi determinado seguindo a fórmula sugerida pelo fabricante do equipamento. Para cada uma das "corridas", a água foi utilizada como controle negativo, e o produto das reações foi quantificado utlilizando-se o programa do próprio fabricante (LightCycler Relative Quantification Software - Roche Diagnostics GmbH). GAPDH foi utilizado como o gene de referência ("*housekeeping*") para a normalização dos valores.

4.9 Processamento histológico

Os dentes extraídos foram fixados em uma solução de formol a 10% (pH=7.4) por 48 horas. Os dentes foram lavados em água destilada e desmineralizados numa solução de EDTA a 10% com solução tampão de fosfato sob constante agitação, renovada a cada 24 horas, durante cerca de 3 meses. Os espécimes desmineralizados foram lavados em água corrente, desidratados em álcool, diafanizados em xilol e embebidos em parafina. Cortes no sentido mesio - distal com espessura de 7µm foram obtidos e corados em hematoxilina e eosina.

4.10 Microscopia eletrônica de varredura

Os dentes extraídos foram fixados em uma solução de formol a 10% (pH=7.4) por 48 horas. Estes passaram por um processo de desidratação com acetona em concentrações crescentes a 25%, 50%, 75%, 90% e acetona pura, sendo realizada imersões sucessivas de 20 minutos.

Os espécimes foram montados em suportes metálicos (stubs) e levados para secagem em estufa por 24 horas. Posteriormente, os espécimes passaram por um processo de metalização com uma camada de aproximadamente 100 a 200Å de liga áurea.

As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (Jeol, modelo-JSM5600, Noran Instruments, USA) com aumento variando de 270 a 900 vezes e aceleração de 5 e 20 Kv. Para ambas as análises histológicas foi avaliada toda a superfície radicular considerando a presença e ausência de cemento dental.

4.11 - Análise Estatística

Utilizando-se do teste t de Student (α=5%) foi realizada uma análise intergrupo com o objetivo de se determinar os genes que são regulados (estímulo ou inibição) na presença ou não do cemento dental. Os valores médios dos genes OPG/RANKL foram comparados estatisticamente

utilizando-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney, com um nível de significância de 5%.

5 – RESULTADOS

5.1 - Observações Clínicas

Durante todo o período de cicatrização, não ocorreu supuração ou formação de abscessos. Em apenas 2 casos houve retração gengival (cerca de 2 mm), com exposição da parte coronal da

membrana; nestes casos o controle pós operatório do biofilme foi realizado com a aplicação diária de clorexidina gel a 1% e não houve maiores complicações. No dia da coleta do tecido de granulação e extração dental os tecidos moles estavam completamente cicatrizados, sem sinais clínicos de inflamação.

5.2 - Observações Histológicas

A analise histológica de microscopia de luz mostrou que no grupo teste, na região do defeito, pôde-se comprovar que o cemento dental foi mantido, conforme proposta do presente estudo. Nos dentes do grupo controle, observou-se que a camada de cemento dental havia sido removida com exposição da dentina **(Figuras 3 e 4).**

5.3 - Observações da Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica foi utilizada para produzir imagens de toda superfície radicular exposta ao defeito. As imagens obtidas foram analisadas quanto à presença ou ausência do cemento dental. Um intervalo entre dois aumentos foi utilizado, um de 270 vezes e outro de 900 vezes, com o objetivo de buscar a maior definição possível de detalhes. Desta forma observou-se que no grupo teste foi mantida a camada de cemento dental, enquanto que no grupo controle observou-se exposição da superfície dentinária **(Figuras 5 e 6)**.

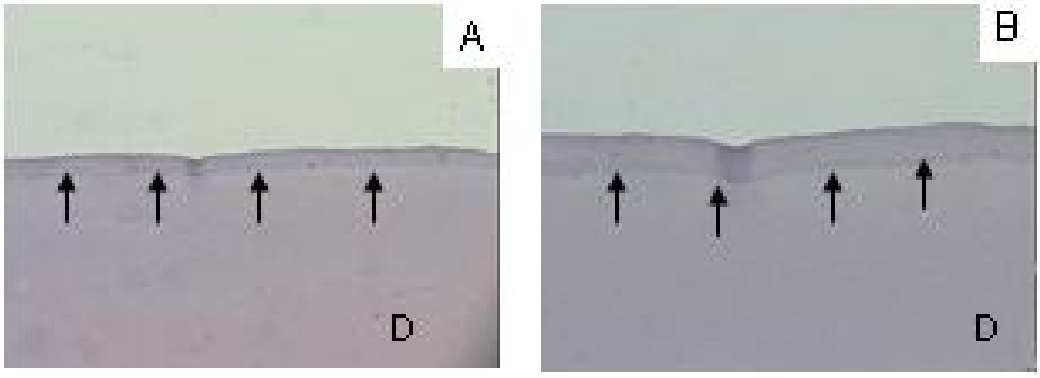


Figura 3 – Fotomicrografias ilustrativas dos achados histológicos no Grupo B, onde o cemento foi preservado. A e B: Aspecto histológico da região do defeito, onde pode-se observar uma espessa camada de cemento remanescente (setas). Cortes mesio-distais, coloração H&E, aumento original - 5x (em A) e 10x (em B). D=dentina.

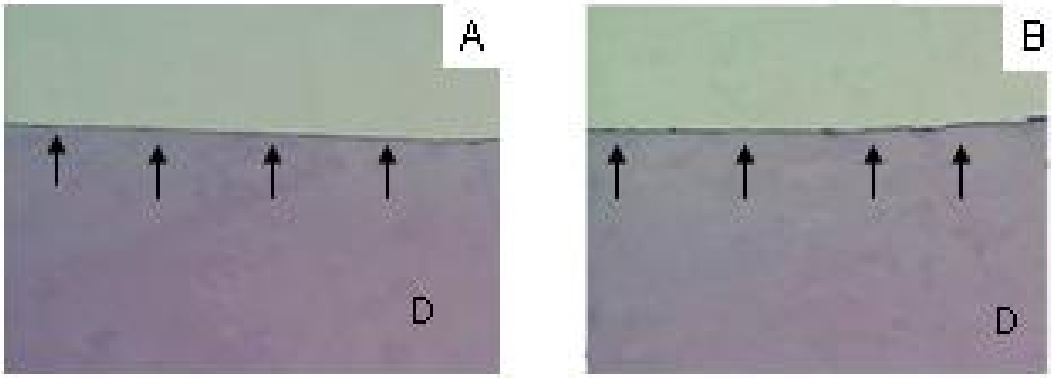


Figura 4– Fotomicrografias ilustrativas dos achados histológicos no Grupo A, onde o cemento foi removido. A e B: Aspecto histológico da região do defeito, onde pode-se observar a dentina e ausência do cemento dental (setas). Cortes mesio-distais, coloração H&E, aumento original - 5x (em A) e 10x (em B). D=dentina.

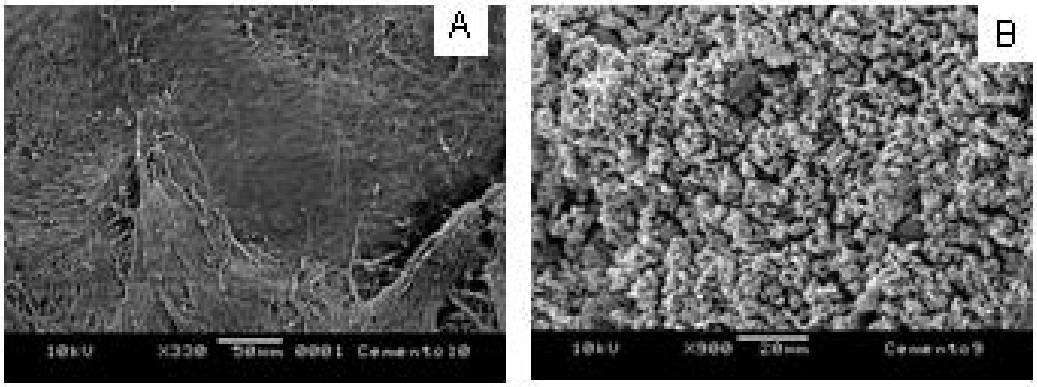


Figura 5: Microscopia eletrônica de varredura da superfície radicular mostrando a presença do cemento dental. A :aumento de 330x e B : aumento de 900x.

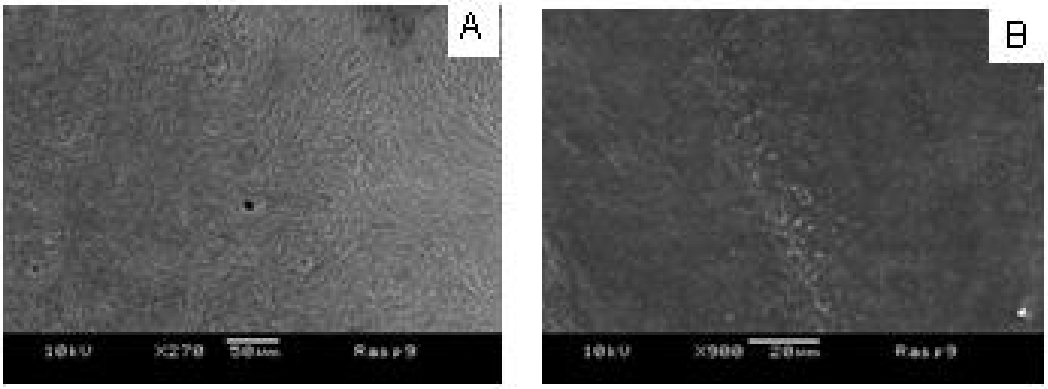


Figura 6: Microscopia eletrônica de varredura da superfície radicular mostrando ausência de cemento dental e exposição da camada dentinária. A: aumento de 270x e B :aumento de 900x.

5.4 - Resultados da expressão gênica

No presente estudo procurou-se dividir os genes pesquisados em relação a: (1) formação/regeneração de osso e cemento dental, (2) processo inflamatório e (3) a degradação da matriz. De acordo com os resultados obtidos pôde-se observar uma diferença estatisticamente significante, entre os grupos controle e teste, em relação a alguns dos genes estudados.

5.4.1 - Análise quantitativa da expressão de genes relacionados ao processo de formação/ regeneração de cemento dental

A análise quantitativa revelou não haver diferença estatisticamente significante na expressão dos níveis mRNAs entre os grupos controle e teste, respectivamente, para: fosfatase alcalina (0,85±0,28 e 0,83±0,21; p=0,872) , osteopontina (0,55±0,15 e 0,45±0,13; p=0,139), RANKL (0,27±0,09 e 0,33±0,08; p= 0,147) e osteoprotegerina (1,15±0,39 e 1,01±0,37; p= 0,434) **(Gráficos 1, 2, 3 e 4)**. Foi avaliada a proporção entre as médias de RANKL e OPG para ambos os grupos. Os resultados mostraram não haver diferença significativa na proporção RANKL: OPG entre os grupos controle e teste, respectivamente (4,41±1,60 e 3,32 ±1,82; p=0,104) **(Gráfico 5)**.

Quando avaliados os níveis de mRNAs para osteocalcina (3,84±1,01 e 1,83±0,57; p=0,001), colágeno I (3,98±1,07 e 2,85±0,99; p=0,024) e colágeno III (2,59±0,99 e 1,39±0,76; p=0,008), observou-se que o grupo teste apresentou uma menor expressão destes genes comparado ao grupo controle **(Gráficos 6 , 7 e 8)**. Enquanto que os níveis de mRNAs de PDGF-1 (1,78±0,45 e 2,53±0,40; p=0,001), bFGF (7,07±1,20 e 9,77±2,35; p=0,005) e BSP (16,43±3,93 e 23,34±3,19; p=0,001) foram significativamente mais altos no grupo teste **(Gráficos 9 , 10 e 11)**.

Em relação aos genes BMP-2 e 3 e TGF-ß não foram observadas a expressão de mRNAs para ambos os grupos.

Gráfico 1 – Valores médios e desvio padrão para os níveis de mRNA Fosfatase Alcalina nos grupos controle e teste.

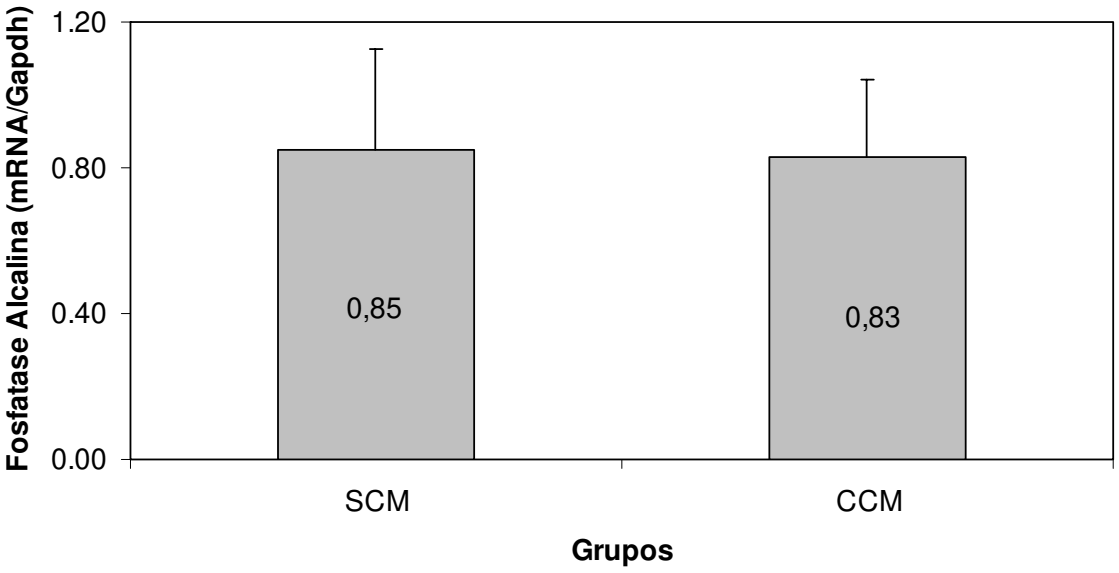


Gráfico 2 – Valores médios e desvio padrão para os níveis de mRNA Osteopontina nos grupos controle e teste.

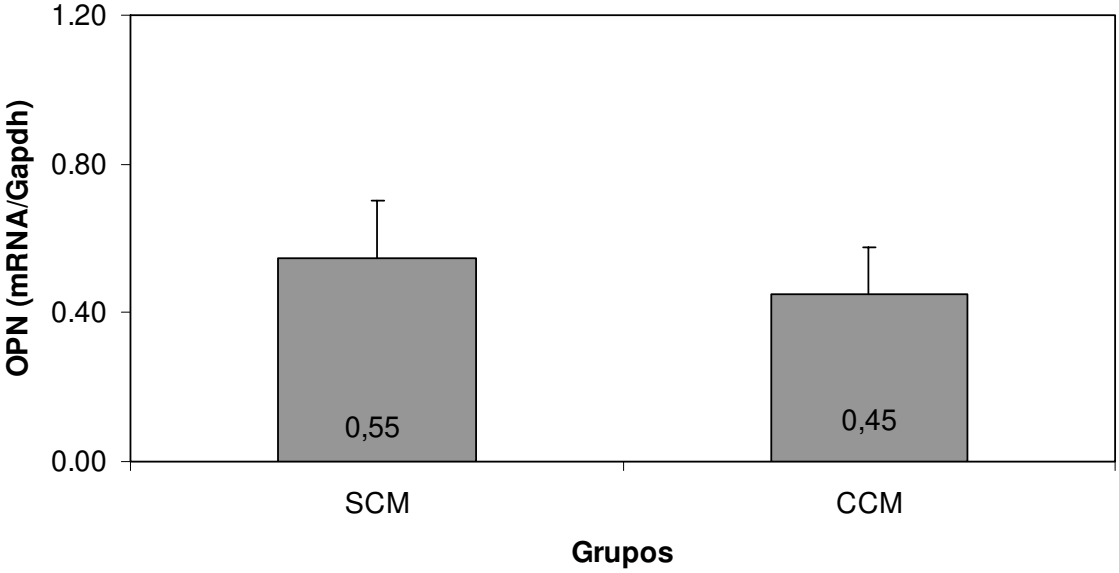


Gráfico 3 – Valores médios e desvio padrão para os níveis de mRNA RANKL nos grupos controle e teste.

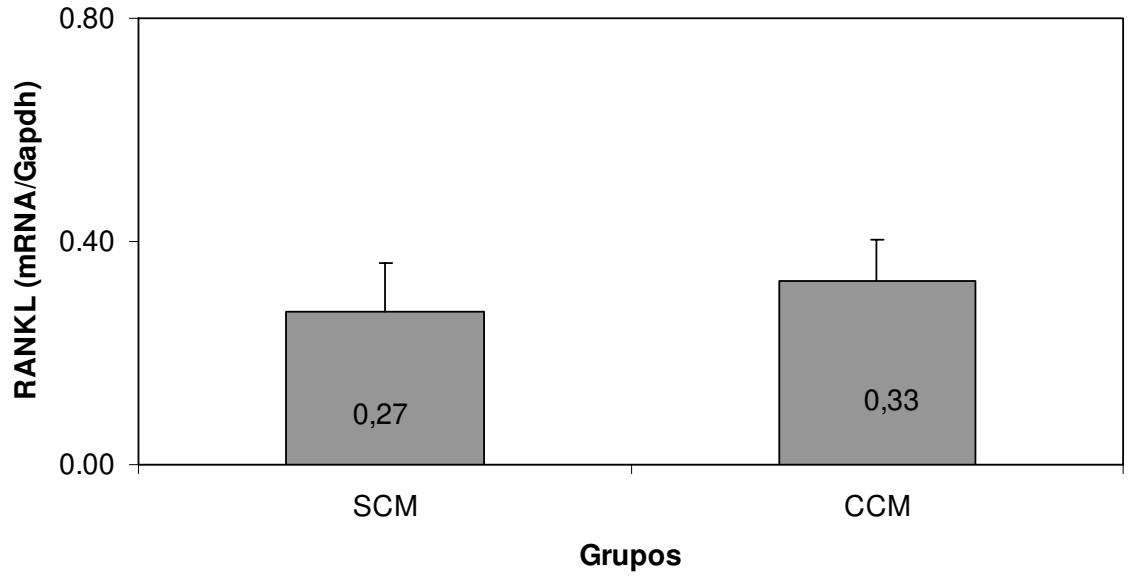


Gráfico 4 – Valores médios e desvio padrão para os níveis de mRNA OPG nos grupos controle e teste.

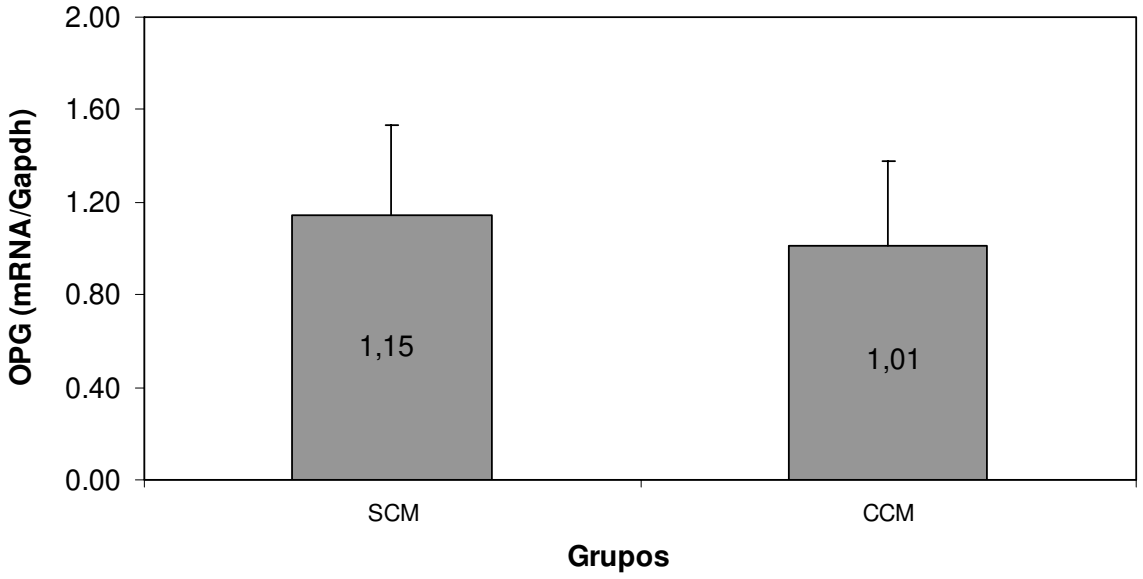


Gráfico 5 – Valores da relação entre os níveis médios de mRNA para OPG e para RANKL

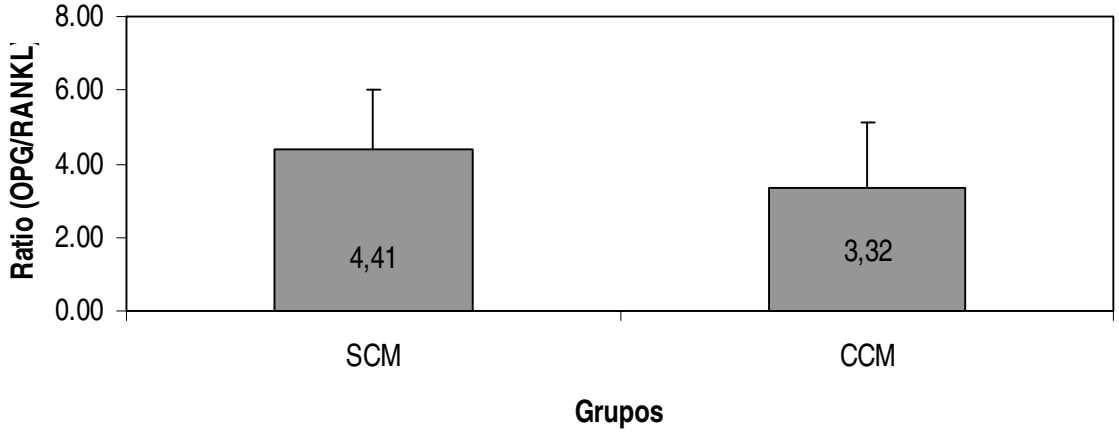
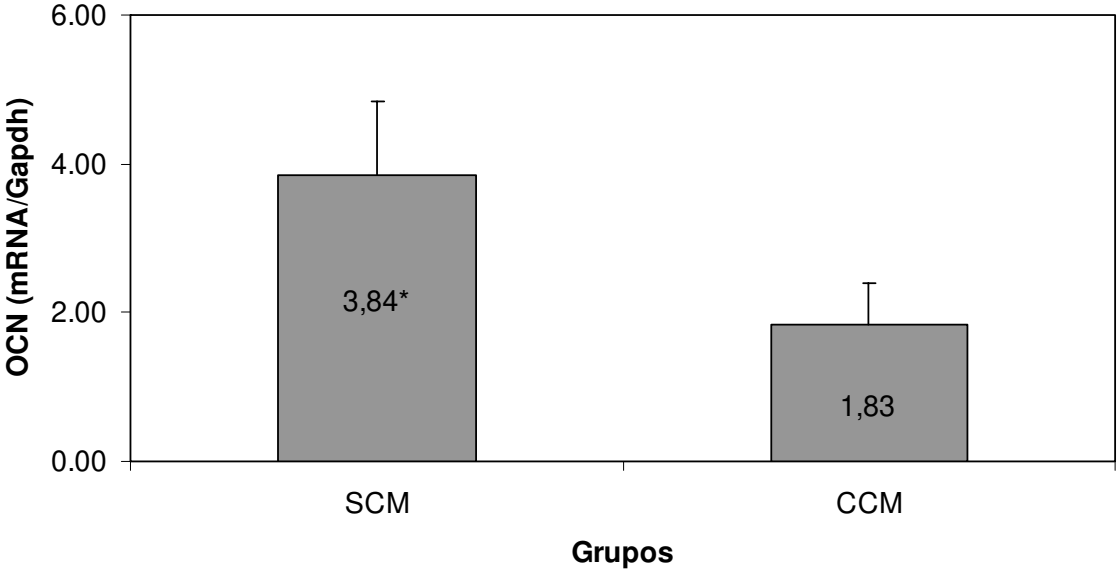
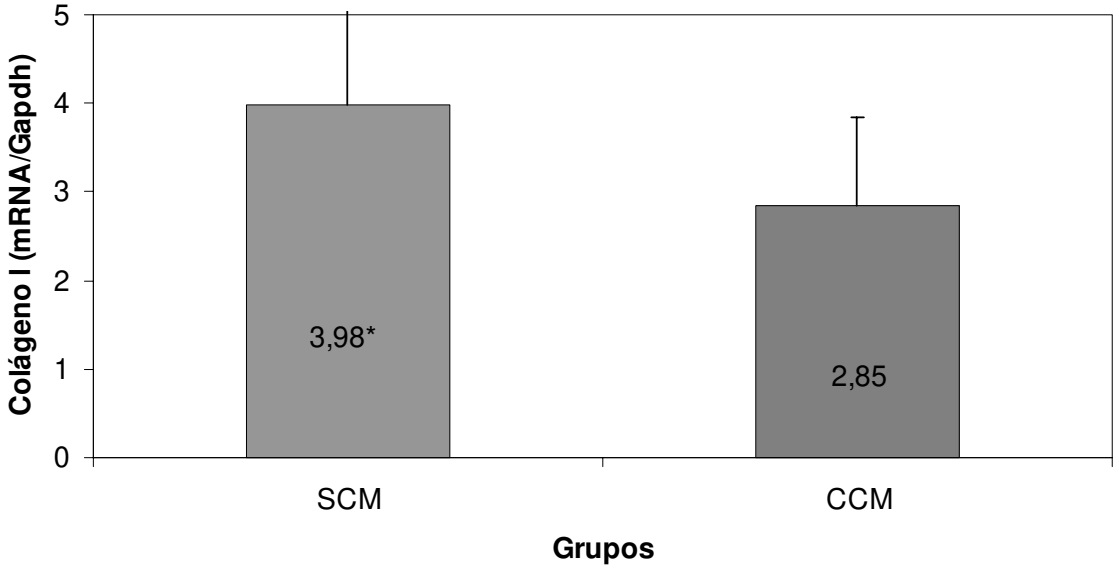


Gráfico 6 – Valores médios e desvio padrão para os níveis de mRNA OCN nos grupos controle e teste.



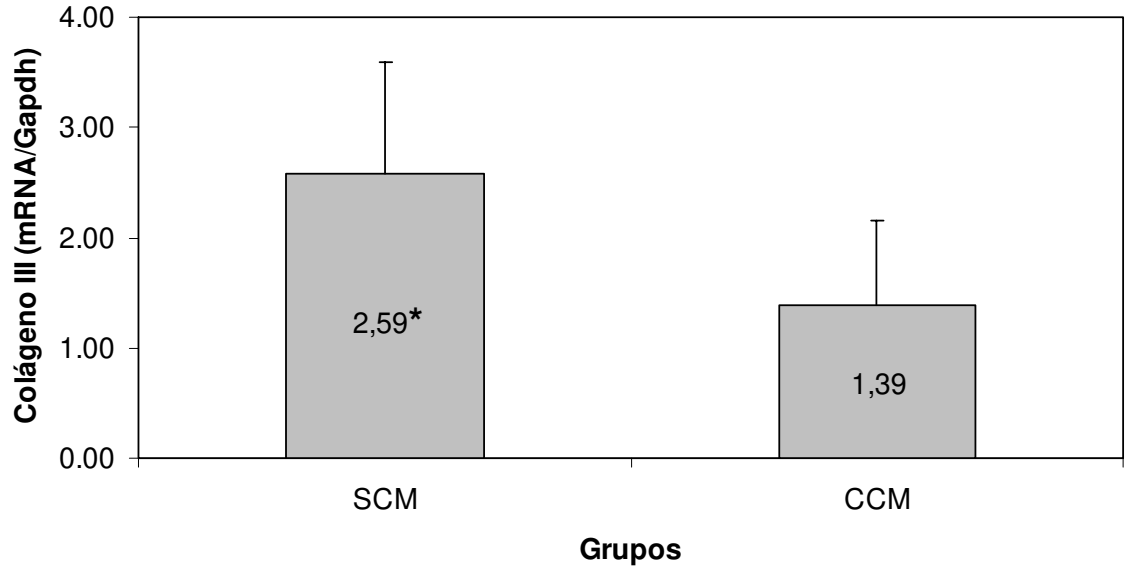
*Estatisticamente significante, p<0,05 (teste t).

Gráfico 7 – Valores médios e desvio padrão para os níveis de mRNA COL I nos grupos controle e teste.



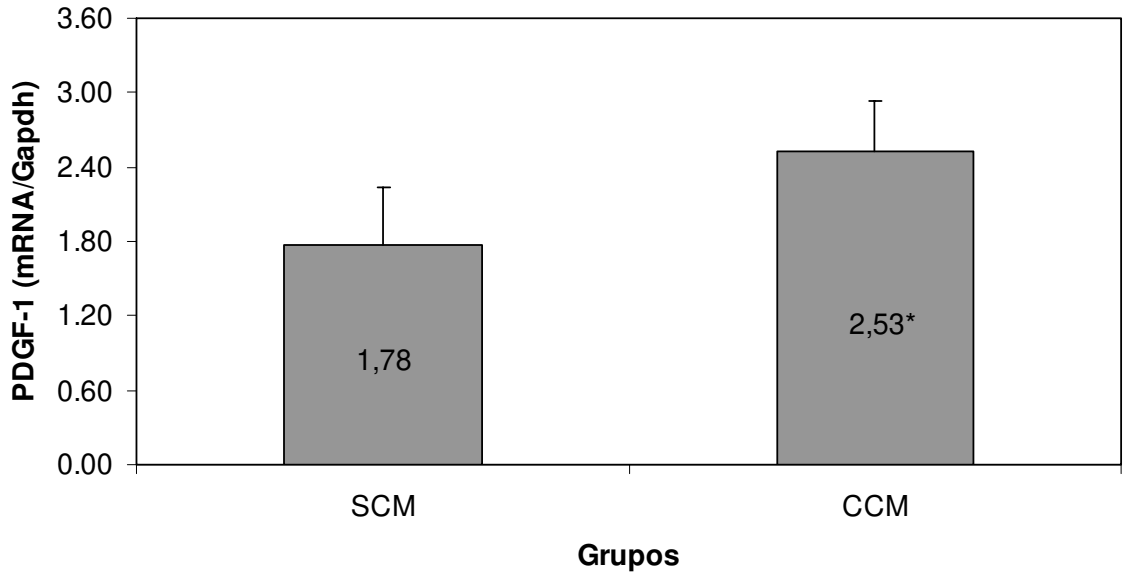
*Estatisticamente significante, p<0,05 (teste t).

Gráfico 8 – Valores médios e desvio padrão para os níveis de m RNA COL III nos grupos controle e teste.



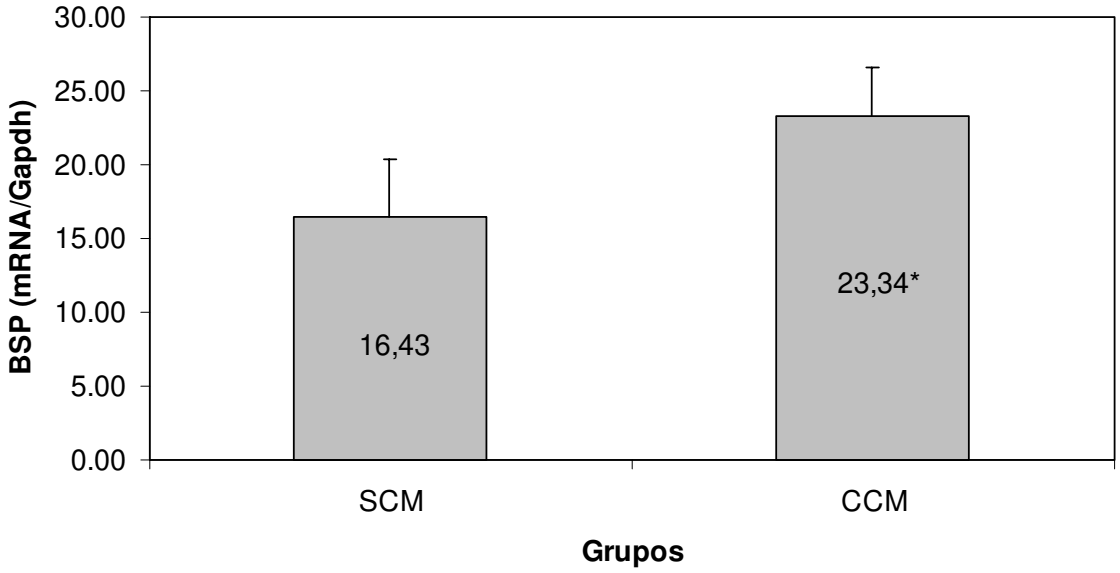
*Estatisticamente significante, p<0,05 (teste t).

Gráfico 9 – Valores médios e desvio padrão para os níveis de mRNA PDGF-1 nos grupos controle e teste.



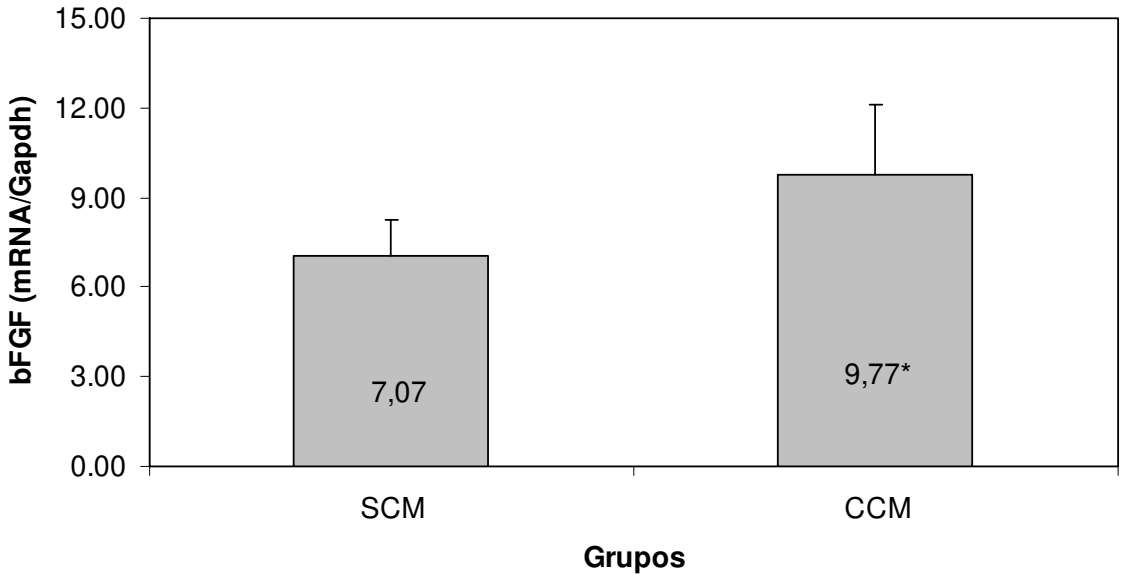
*Estatisticamente significante, p<0,05 (teste t).

Gráfico 10 – Valores médios e desvio padrão para os níveis de mRNA BSP nos grupos controle e teste.



*Estatisticamente significante, p<0,05 (teste t).

Gráfico 11 – Valores médios e desvio padrão para os níveis de mRNA bFGF nos grupos controle e teste.



*Estatisticamente significante, p<0,05 (teste t).

5.4.2 - Análise quantitativa da expressão de genes relacionados ao processo inflamatório

Quando avaliados os genes relacionados ao processo inflamatório, os resultados demonstraram que os níveis de mRNA para IL-1ß (0,39±0,17 e 0,39±0,19; p=1,00) e IL-6 (0,23±0,09 e 0,23±0,07; p=1,00) não apresentavam diferença estatística. Porém quando avaliados os níveis de mRNA para IL-4 observou-se uma maior expressão no grupo teste, sendo esta estatisticamente significante (14,89±4,14 e 24,01±7,00;p=0,002) **(Gráficos 12 , 13 e 14)**.

Gráfico 12 – Valores médios e desvio padrão para os níveis de mRNA IL-1 ß nos grupos controle e teste.

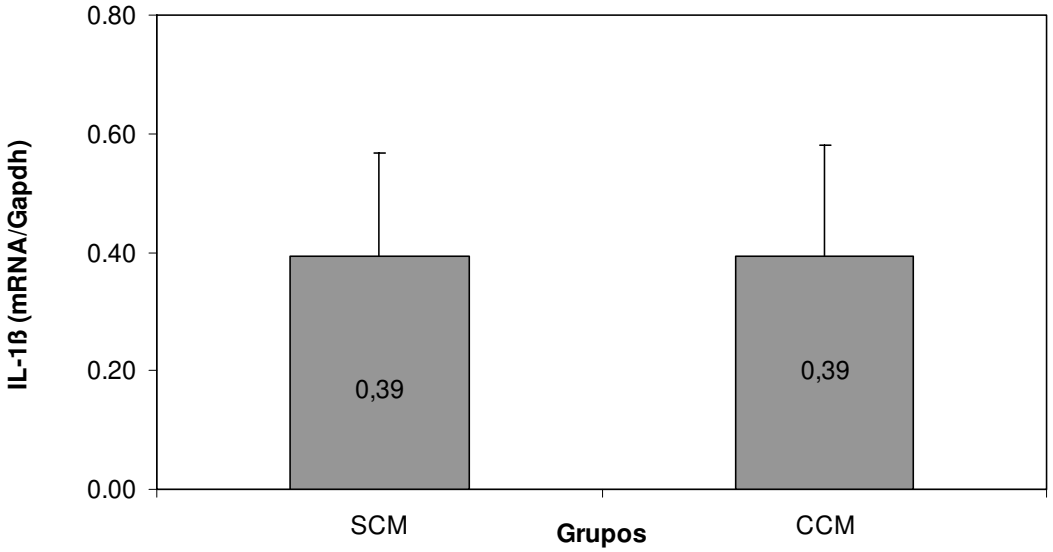


Gráfico 13 – Valores médios e desvio padrão para os níveis de mRNA IL-6 nos grupos controle e teste.

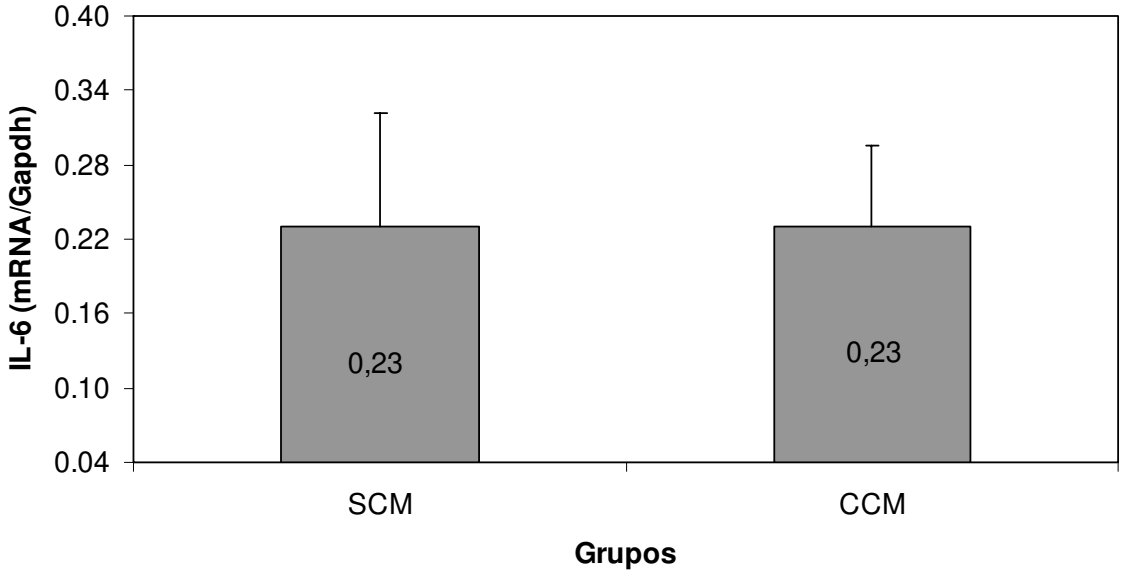
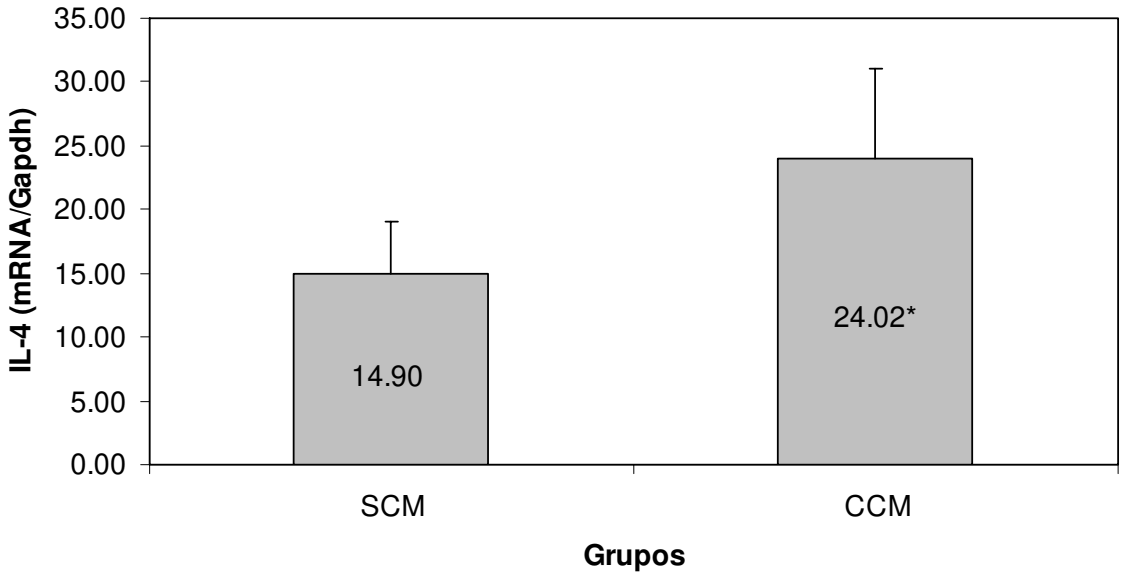


Gráfico 14 – Valores médios e desvio padrão para os níveis de mRNA IL-4 nos grupos controle e teste.

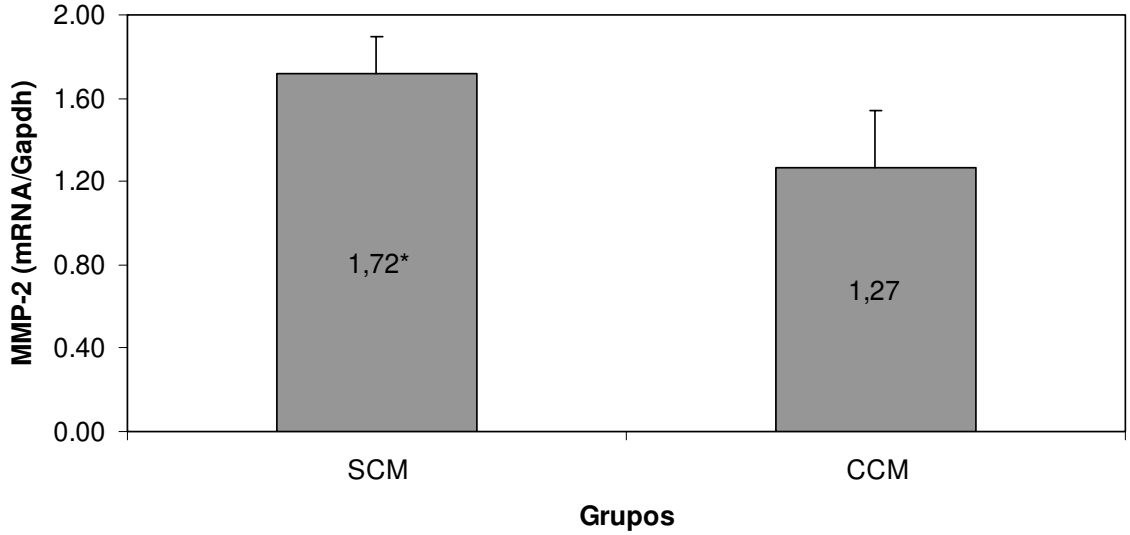


*Estatisticamente significante, p<0,05 (teste t).

5.4.3 - Análise quantitativa da expressão de genes relacionados ao processo de degradação da matriz

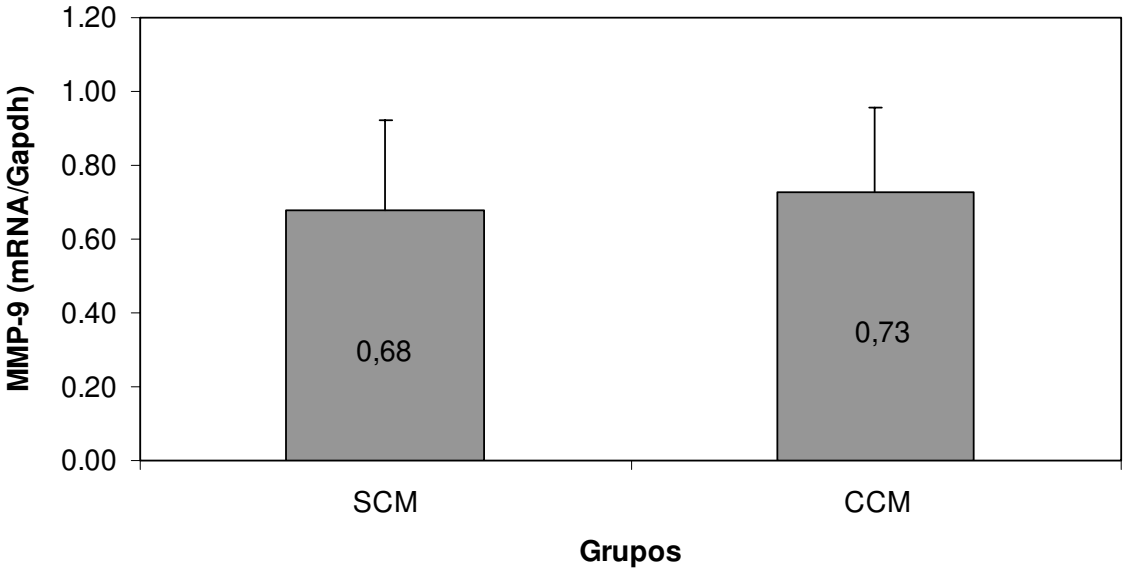
Em relação à quantificação de genes relacionados ao processo de degradação da matriz, foram avaliados no presente estudo os níveis de mRNA de MMP-2 e MMP-9 expressos nos grupos controle e teste. Os resultados mostraram que para a MMP-2 foi encontrada uma diferença estatística no nível de mRNA entre os grupos (1,72±0,18 e 1,27±0; p=0,001), enquanto que para a MMP-9 não foi encontrada nenhuma diferença estatística entre os grupos (0,69±0,24 e 0,73±0,23; p=0,657) **(Gráficos 15 e 16)**.

Gráfico 15 - Valores médios e desvio padrão para os níveis de mRNA MMP-2 nos grupos controle e teste.



*Estatisticamente significante, p<0,05 (teste t).

Gráfico 16 - Valores médios e desvio padrão para os níveis de mRNA MMP-9 nos grupos controle e teste.



6 – DISCUSSÃO

Um dos principais desafios da terapia periodontal contemporânea tem sido o

restabelecimento do ligamento periodontal, cemento dental e osso alveolar perdidos durante o processo da doença periodontal inflamatória. Segundo o paradigma atual da regeneração periodontal, o sucesso na neoformação dos tecidos periodontais de suporte depende da migração e proliferação das células do ligamento periodontal remanescentes, acompanhada pela subseqüente diferenciação em osteoblastos, cementoblastos e fibroblastos, e síntese de componentes das matrizes teciduais. Com a melhor compreensão dos mecanismos moleculares e celulares envolvidos na regeneração periodontal, sabe-se que todos esses eventos celulares são regulados por vários mediadores biológicos tais como, citocinas e fatores de crescimento, presentes nos tecidos periodontais remanescentes e secretados pelas células inflamatórias nas fases iniciais de reparo da ferida periodontal (Clark *et al.,* 1996).

O cemento radicular constitui um tecido rico em proteínas não colagenosas (osteopontina e sialopreína óssea) e fatores de crescimento (BMP-2, -3, -4, PDGF, TGF-β e IGF-I), os quais possuem, *in vitro*, a habilidade de promoverem a proliferação e a diferenciação de células progenitoras localizadas no ligamento periodontal (Saygin *et al*., 2000). Atualmente, comprovou-se que os lipopolissacarídeos bacterianos estão fracamente aderidos ao cemento dental não se justificando um intenso alisamento radicular com o intuito da remoção completa do cemento (Daly *et al*., 198). Desta maneira, o presente estudo teve como objetivo caracterizar o perfil de expressão gênica do tecido de granulação formado em defeitos infraósseos tratados pelo princípio da RTG na presença ou não de cemento dental avaliou se a preservação do cemento dental.

Após a coleta e avaliação das amostras pôde-se observar que a prevalência da expressão de mRNA de RANKL e OPG foram similares nos grupos controle e teste. A expressão de RANKL e OPG é regularmente encontrada em pacientes saudáveis fazendo parte do processo de regulação da remodelação óssea, através da interação entre osteoclasto e osteoblasto (Theoleyre *et al*., 2004). Estudos afirmam que o RANKL está diretamente relacionado ao processo de reabsorção óssea (Teitebaum 2000), e este é bloqueado pela ação da OPG que leva a uma diminuição da perda óssea alveolar (Teng *et al*., 2000, Liu *et al*., 2003), tornando a OPG uma molécula protetora da massa óssea. Estes genes podem ser inibidos ou estimulados por inúmeras substâncias como IL-1, TNF-α ,TGF-ß que podem agir diretamente em células ósseas ou através da ativação via osteoclastos, sendo esta via considerada a chave da regulação do processo de reabsorção/aposição óssea.

Em relação aos genes presentes no processo inflamatório, foram avaliados a IL - 1ß, IL - 6

e IL - 4, pôde observar que a intensidade de expressão de mRNA de IL - 1ß, IL - 6 foi similar nos grupos controle e teste, podendo-se sugerir que este fato pode ter ocorrido devido à similaridade da época em que os tecidos foram coletados (21 dias após o tratamento do defeito e colocação da membrana). A literatura tem demonstrado que citocinas como a IL - 1 e IL - 6, consideradas citocinas pró-inflamatórias, estão diretamente relacionadas com o estímulo da atividade osteoclástica e de degradação da matriz através da estimulação da expressão de RANKL e MMPs (Ting *et al*., 2004). No presente estudo observou-se que, para os valores de RANKL e MMP-9 não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos, confirmando assim os achados na literatura que correlacionam estes genes. Quanto ao mRNA de IL - 4 observou-se uma maior expressão deste gene no grupo onde o cemento dental foi mantido, porém quando avaliados os genes relacionados a sua atividade anti-inflamatória, foi possível observar que apesar deste apresentar maior expressão no grupo teste sua influência na expressão de outros genes como OPG, não foi observada.

Outras substâncias também relacionadas ao processo de remodelação óssea foram avaliadas, dentre elas encontram-se a osteopontina, osteocalcina e fosfatase alcalina. A osteocalcina é considerada a substância não colágena mais abundante na matriz óssea extracelular, estando fortemente relacionada ao processo de maturação celular, sendo normalmente expressa por cementoblastos (Nociti *et al*., 2004). A osteopontina também relacionada ao processo de mineralização é normalmente encontrada em tecido ósseo já mineralizado. No presente estudo não foi encontrada diferença estatisticamente significante de expressão de mRNAs de genes relacionados osteopontina e fosfatase alcalina, porém encontrou-se diferença entre os grupos na expressão de m RNA de osteocalcina.

A matriz extracelular é um sistema complexo responsável pelas propriedades fisiológicas do tecido conjuntivo. Em situações inflamatórias há uma quebra nesta homeostasia levando a um aumento na expressão de MMPs em relação ao seu inibidor e a uma maior degradação de moléculas como o colágeno. De acordo com os resultados deste estudo, houve uma diferença estatística em relação à expressão gênica de MMP-2. Em relação à expressão gênica da MMP-9, não foi encontrada nenhuma diferença estatística entre os grupos, porém este estava quantitativamente mais expresso no grupo teste. A expressão gênica de colágeno tipo I e III também foram avaliadas, onde se constatou uma diferença estatística entre os grupos favorecendo o grupo controle na expressão destas moléculas, assim, a presença destes genes confirmam que o correto

tempo da coleta do tecido de granulação. Porém, estes resultados discordam dos encontrados por Séguier e colaboradores (2001), onde puderam observar que o aumento da expressão de MMP-2, 9, 1, e 13, associado à diminuição de seu inibidor, resulta na degradação de moléculas de colágeno.

Genes relacionados ao processo de regeneração, como o PDGF, foi estudado. A literatura apresenta-se conclusiva em relação à atuação do PDGF no processo de regeneração periodontal por meio da estimulação de células envolvidas neste processo, podendo este atuar na osteogênese e vascularização da região. O PDGF tem mostrado resultados expressivos na promoção do reparo ósseo e tecido mole. Estudos demonstram que o mecanismo de ação do PDGF está relacionado a presença de receptores na superfície de células do ligamento periodontal, ósseas e epitélio gengival (Green *et al*., 1997, Pinheiro *et al*., 2003). Observou-se que houve uma expressão significativa de mRNA do PDGF -1 no grupo onde o cemento dental foi mantido, levando a crer que a preservação do cemento dental pode estar fortemente relacionada a um possível processo de regeneração periodontal. É possível especular que apesar maior expressão de PDGF - 1 ter sido no grupo onde o cemento dental foi mantido era esperada também a expressão de BMPs principalmente neste grupo.

Resultados de pesquisas em animais sugerem que as BMPs têm a habilidade de estimular a regeneração de tecidos periodontais, incluindo o cemento dental, por possuir uma grande quantidade de mediadores que estimulam a osteoindução (Giannobile *et al*.,1998) e sugerem ainda que BMPs associados a fatores de crescimento como o PDGF possuem várias aplicações clínicas (Bartold *et al*.,2000). Estudos atuais indicam que BMPs são potentes indutores de diferenciação oetoblástica ,*in vitro*, e apresentam uma forte relação com a formação óssea, *in vivo* (Giannobile *et al*.,1998). Devido sua a importância em relação ao processo de regeneração periodontal, principalmente óssea, a BMP – 2, BMP - 3 e o TGF - ß, foram selecionados, porém não foram identificadas expressões destes no presente estudo, possivelmente porque estes genes normalmente são expressos em um período mais tardio do processo de regeneração (King & Cochoran, 2002).

Finalmente, a recente disponibilização de culturas de cementoblastos animais e humanos (D'Errico *et al*, 2000; Saito *et al*, 2005) tem nos possibilitado estudar o papel destas células na modulação dos processos de cicatrização periodontal. Estudos *in vitro* mostraram que os cementoblastos expressam genes associados à mineralização (como sialoproteína óssea e osteocalcina), promovem a formação de nódulos minerais e respondem a fatores de crescimento e

hormônios osteotrópicos (Giannobile *et al*, 2001, Saygin *et al*, 2000a e 2000b). Adicionalmente, estudos *in vivo* mostraram que os cementoblastos têm uma grande habilidade em induzir mineralização em defeitos periodontais do tipo fenestração, quando transplantados via esponja de colágeno (Zhao *et al*., 2004, Jin *et al*., 2004).

Apesar de estudos prévios (Gonçalves et al., 2006) terem mostrado que a presença do cemento dental pode modular a regeneração periodontal, *in vivo,* até o presente momento não havia evidências científicas que explicassem diretamente os mecanismos pelos quais a preservação do cemento dental poderia modular a regeneração periodontal, sendo este o primeiro estudo *in vivo* que revela o papel do cemento frente à modulação de genes relacionados ao processo de regeneração. Além do que, o presente estudo coletou amostra em um dado período de tempo (21 dias), sendo por este motivo, difícil determinar a cinética dos eventos durante todo o curso do processo regenerativo**.** Em suma, podemos especular que a presença do cemento dental poderia favorecer a regeneração periodontal por ser, comprovadamente, fonte de fatores de crescimento presentes em sua matriz.

Os resultados do presente estudo não deverão ser interpretados de modo a dizer que os genes aqui encontrados irão expressar suas respectivas proteínas, pois a amostra foi coletada em um dado período, assim não podemos extrapolar estes resultados para períodos anteriores ou posteriores da coleta da amostra. Entretanto, os presentes resultados suportam a visão de que o cemento dental pode modular a resposta tecidual, em especial, quando uma técnica regenerativa (como a RTG) é utilizada. Todavia, estudos adicionais são necessários para investigar cineticamente e, não somente de maneira pontual, o papel do cemento dental na regeneração periodontal, em termos de genes envolvidos no processo regenerativo.

7 - CONCLUSÃO

Dentro dos limites do presente estudo, pôde-se concluir que o cemento dental pode modular o processo de regeneração periodontal, regulando a expressão dos genes PDGF - 1, bFGF, BSP , IL – 4 , OCN, Col I e Col III.

REFERÊNCIAS*:

Adelson LJ, Hanks CT, Ramfjord SJ, Caffesse RG. Cytotoxicity of periodontally diseased root surfaces. *J Periodontol* 1980; 51:700–704.

Adriaens PA, DeBoever JA, Loesche WJ. Bacterial invasion in root cementum and radicular dentine of periodontally diseased teeth in humans. *J Periodontol* 1988; 59:222-230.

Adriaens PA, Edwards CA, De Boever JA, Loesche WJ. Ultrastructural observations on bacterial invasion in cementum and radicular dentin of periodontally diseased human teeth. *J Periodontol* 1988; 59: 493-503.

Aleo JJ, de Renzis FA, Farber PA, Varboncoeur AP. The presence and biologic activity of cementum-bound endotoxin. *J. Periodontol* 1974; 45: 672-675.

Aleo JJ, de Renzis FA, Farber PA. *In vitro* attachment of human gingival fibroblasts to root surfaces. *J. Periodontol* 1975; 46:639-645.

Alvarez-Perez MA, Narayanan S, Zeichner-David M, Rodriguez Carmona B, Arzate H. Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). Bone. 2006 Mar;38(3):409-19.

Amar S, Chung KM, Nam SH, Karatzas S, Myokai F, Van Dyke TE. Markers of bone and cementum formation accumulate in tissues regenerated in periodontal defects treated with expanded polytetrafluoroethylene membranes. *J Periodontal Res* 1997; 32(1 Pt 2): 148-58.

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; 6(11): 2990-5.

Bergenholtz G, Lindhe J. Effect of experimentally induced marginal periodontitis and periodontal scaling on the dental pulp. *J Clin Periodontol* 1978 Feb;5(1):59-73

* De acordo com as normas da Unicamp/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Blömlof L, Lindskog S, Appelgren R, Jonsson B, Weintraub A, Hammarström L. New attachment in monkeys with experimental periodontitis with and without the removal of the cementum. *J Clin Periodontol* 1987; 16:27-32.

Blömlof L, Lindskog S, Appelgren R, Jonsson B, Weintraub A, Hammarstrom L. New attachment in monkeys with experimental periodontitis with and without removal of the cementum. *J Periodontol* 1994; 65(7): 731-3.

Bosshardt DD, Schröeder HE. Establishment of acellular extrinsic fiber cementum on human teeth. A light- and electron-microscopic study. *Cell Tissue Res* 1991; 263(2): 325-36.

Bosshardt DD, Selvig KA. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol 2000* 1997; 13:41-75.

Bravman RJ, Everhart DL, Stahl SS. A cementum-bound antigen: its reaction with serum antibody and localization, in situ. *J Periodontol* 1979; 50(12):656-60.

Brown WA. Resorption of permanent teeth. *Br J Orthod* 1982; 9(4):212-20

Cadosch J, Zimmermann U, Ruppert M, Guindy J, Case D, Zappa U. Root surface debridement and endotoxin removal. *J Periodontal Res* 2003; 38(3):229-36.

Carey HM, Daly CG. Subgingival debridement of root surfaces with a micro-brush: macroscopic and ultrastructural assessment. *J Clin Periodontol* 2001;28(9):820-7.

Checchi L, Pelliccioni GA. Hand versus ultrasonic instrumentation in the removal of endotoxins from root surfaces in vitro. *J Periodontol* 1988; 59(6):398-402.

Cheetham WA, Wilson M, Kieser JB. Root surface debridement. An *in vitro* assessment. *J Clin Periodontol* 1988 15: 288–292.

Cho MI, Garant PR. Ultrastructural evidence of directed cell migration during initial cementoblast differentiation in root formation. *J Periodontal Res* 1988; 23(4): 268-76.

Christersson LA, Zambon JJ, Genco RJ. Dental bacterial plaques. Nature and role in periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1991; 18:441-446.

Clark RAF. Wound repair. Overview and general considerations.In: Clark RAF, editor. The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair, 2nd edn. New York, NY: Plenum Press, 1996: 3–50.

Cogen RB, Garrison DC, Weatherford TW. Effect of various root surface treatments on the viability and attachment of human gingival fibroblasts. *J Periodontol* 1983; 54(5): 277-82.

Coldiron NB, Yukna RA, Weir J, Caudill RF. A quantitative study of cementum removal with hand curettes. *J Periodontol* 1990; 61:293-299.

Daly CG, Kieser JB, Corbet E, Seymour GJ. Cementum involved in periodontal disease: a review of its features and clinical management. *J Dentistry* 1979; 7:185-193.

Daly CG, Seymour GJ, Kieser JB, Courbet EF. Histological assessment of periodontally involved cementum. *J Clin Periodontol* 1982; 9:266-274.

Daly CG, Seymour GJ, Kieser JB. Bacterial endotoxin: a role in chronic inflammatory periodontal disease? *J Oral Pathology* 1980; 9:1-15.

Dastmalchi R, Polson A, Bouwsma O, Proskin H. Cementum thickness and mesial drift. *J Clin Periodontol* 1990; 17(10): 709-13.

Denton GB. The discovery of cementum. *J Dent Res* 1939; 18: 239-242.

D'Errico JA, Berry JE, Ouyang H, Strayhorn CL, Windle JJ, Somerman MJ. Employing a transgenic animal model to obtain cementoblasts *in vitro*. *J Periodontol* 2000 71:63-72.

Fine DH, Morris ML, Tabak L, Cole JD. Preliminary characterization of material eluted from the roots of periodontally diseased teeth. *J Periodontal Res* 1980; 15:10-19.

Foster BL, Nociti FH Jr, Swanson EC, Matsa-Dunn D, Berry JE, Cupp CJ, Zhang P, Somerman MJ. Regulation of cementoblast gene expression by inorganic phosphate in vitro. Calcif Tissue Int. 2006

Feb;78(2):103-12.

Friskopp J, Hammaström L. A comparative, scanning electron microscope study of supragingival and subgingival calculus. *J Periodontol* 1980; 51: 553-562.

Fukazawa E, Nishimura K. Superficial cemental curettage: its efficacy in promoting improved cellular attachment on human root surfaces previously damaged by periodontitis. *J Periodontol* 1994; 65(2):168-76.

Gonçalves PF, Gurgel B,Pimentel S,Sallum E,Sallum A,Casati M,Nociti FH. Effect of two differents approaches for root decontamination on new cementum formation following guided tissue regeneration: Histomorphometric study in dogs. *J Periodontal Research* 2006.41:535-540.

Giannobile WV, Lee CS, Tomala MP, Tejeda KM, Zhu Z. Platelet-derived growth factor (PDGF) gene delivery for application in periodontal tissue engineering. *J Periodontol* 2001 72:815-23.

Giannobile WV, Ryan S, Shih MS, Su DL, Kaplan PL, Chan TC. Recombinant human osteogenic protein-1 (OP-1) stimulates periodontal wound healing in class III furcation defects. *J Periodontol* 1998 Feb; 69(2): 129-37.

Giannobile WV. Periodontal tissue engineering by growth factors. *Bone* 1996;19 (1 Suppl):23S-37S.

Green, RJ, Usui, ML, Hart, CE, Ammons, WF, Narayanan, AS. Immunolocalization of platelet-derived growth factor A and B chains and PDGF-alpha and beta receptors in human gingival wounds. J. Periodontal Res. 1997;32**,** 209.

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

Hara R, Wato M, Tanaka A. Marker of cemento-periodontal ligament junction associated with periodontal regeneration. *J Periodontal Res* 2005; 40(3): 231-8.

Hatfield CG, Baumhammers A. Citotoxic effects of periodontally involved surfaces of human teeth.

Archives Oral Biology 1971; 61:465-468.

Hughes FJ, Auger DW, Smales FC. Investigation of the distribution of cementum associated lipolysaccharides in periodontal disease by scanning electron microscope. Histochemistry. *J Periodontal Res* 1988; 23:100-106.

Hughes FJ, Smales FC. Immunohistochemical investigation of the presence and distribution of cementum-associated lipopolysaccharides in periodontal disease. *J Periodontal Res* 1986; 21:660-667.

Hunter RK, O'Leary TJ, Kafrawy AH. The effectiveness of hand versus ultrasonic instrumentation in open flap root planing. *J Periodontol* 1984; 55(12):697-703.

Ikezawa K, Hart CE, Williams DC, Narayanan AS. Characterization of cementum derived growth factor as an insulin-like growth factor-I like molecule. *Connect Tissue Res* 1997; 36(4): 309-19.

Ivanovski S, Li H, Daley T, Bartold PM. An immunohistochemical study of matrix molecules associated with barrier membrane-mediated periodontal wound healing. *J Periodontal Res* 2000; 35(3):115-26.

Jin QM, Zhao M, Economides AN, Somerman MJ, Giannobile WV. Noggin gene delivery inhibits cementoblast-induced mineralization. *Connect Tissue Res* 2004; 45:50-9.

Jones SJ. Cement. In: Osborn JW, ed. Dental anatomy and embryology. Boston: Blackwell Scientific, 1981.

Jones W, O'Leary TJ. The effectiveness of *in vivo* root planing in removing bacterial endotoxin from the root of periodontally involved teeth. *J Periodontol* 1978; 49:337-342.

Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD. A review of longitudinal studies that compared periodontal therapies. *J Periodontol* 1994; 65(7):731-3.

Karring T, Nyman S, Lindhe J. Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. *J Clin Periodontol* 1980;7(2):96-105.

Karring T, NymanS, Lindhe J. Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. *J Clin Periodontol* 1980; 7(2): 96-105.

Kepic TJ, O'Leary TJ, Kafrawy AH. Total calculus removal: an attainable objective? *J Periodontol* 1990; 61:16-20.

King G, Cochran D. Factors that modulate the effects of bone morphogenetic protein- Induced periodontal regeneration: a critical review. *J Periodontol* 2002; 73:925-936.

Kocher T, Rosin M, Langenbeck N, Bernhardt O. Subgingival polishing with a teflon-coated sonic scaler insert in comparison to conventional instruments as assessed on extracted teeth (II). Subgingival roughness. *J Clin Periodontol* 2001;28(8):723-9.

Koveker GB. Growth factors in clinical practice. *Int J Clin Pract* 2000; 54(9): 590-3.

Lara VS, Figueiredo F, da Silva TA, Cunha FQ. Dentin-induced *in vivo* inflammatory response and *in vitro* activation of murine macrophages. *J Dent Res* 2003; 82:460-5.

Lerner Ulf H. New molecules in the tumor necrosis factor ligand and receptor superfamilies with importance for physiological and pathological bone resorption. Crit Rev Oral Biol Med 2004;15(2):64-81 .

Lindhe J, Nyman S. Long-term maintenance of patients treated for advanced periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1984; 11(8): 504-14.

Lindskog S, Pierce AM, Blömlof L, Hammarstrom L. The role of the necrotic periodontal membrane in cementum resorption and ankylosis. *Endod Dent Traumatol* 1985; 1:96-101.

Liu CM, Shyu YC, Pei SC, Lan WH, Hou LT. In vitro effect of laser irradiation on cementum-bound endotoxin isolated from periodontally diseased roots. *J Periodontol* 2002; 73(11): 1260-6.

MacNeil RL, D'Errico JA, Ouyang H, Berry J, Strayhorn C, Somerman MJ. Isolation of murine cementoblasts: unique cells or uniquely-positioned osteoblasts? *Eur J Oral Sci* 1998; 106(suppl 1):

350–356.

MacNeil RL, Somerman MJ. Molecular factors regulating development and regeneration of cementum. *J Periodontal Res* 1993; 28(6 Pt 2):550-9.

Maidwell-Smith M, Wilson M, Kieser JB. Lipopolysaccharide (endotoxin) from individual periodontally involved teeth. *J Clin Periodontol* 1987; 14(8): 453-6.

Mandel ID, Gaffar A. Calculus revisited. A review. *J Clin Periodontol* 1986; 13:249-257.

Matsuura M, Herr Y, Han KY, Lin WL, Genco RJ, Cho MI. Immunohistochemical expression of extracellular matrix components of normal and healing periodontal tissues in the beagle dog. *J Periodontol* 1995; 66(7):579-93.

Mc Cauley MK, Somerman MJ. Biologic modifiers in periodontal regeneration. *Dent Clin North Am* 1998; (2):361-87.

Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol* 1976; 47(5):256-60. Review.

Moore J, Wilson M, Kieser JB. The distribution of bacterial lipopolysacharide (endotoxin) in relation of periodontally involved root surfaces. *J Clin Periodontol* 1986; 13:748-751.

Morris ML. The implantation of human dentin and cementum and freshly devitalized autogenous bone into the subcutaneous tissues of the rat. *J Periodontol* 1975;46(5):284-8

Morris ML. The subcutaneous implantation of periodontally diseased roots. *J Periodontol* 1972;43(12):737-47

Nakib NM, Bissada NF, Simmelink JW, Goldstine SN. Endotoxin penetration into root cementum of periodontally healthy and diseased human teeth. *J Periodontol* 1982; 53:368-378.

Nishimine D, O'Leary TJ. Hand instrumentation versus ultrasonics in the removal of endotoxins from root surface.*J Periodontol* 1979;50:345-349.

Nishimura K, Hayashi M, Matsuda K, Shigeyama Y, Yamasaki A, Yamaoka A. The chemoattractive potency of periodontal ligament, cementum and dentin for human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res* 1989; 24:146-8.

Nociti FH Jr, Foster BL, Barros SP, Darveau RP, Somerman MJ. Cementoblast gene expression is regulated by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide partially via toll-like receptor-4/MD-2. J Dent Res. 2004 Aug;83(8):602-7.

Nyman S, Karring T, Lindhe J, Planten S. Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. *J Clin Periodontol* 1980;7(5):394-401.

Nyman S, Sarhed G, Ericsson I, Gottlow J, Karring T. The role of “diseased” root cementum for healing following treatment of periodontal disease. *J Periodontal Res* 1986; 21: 496-503.

Nyman S, Westfelt E, Sarhed G, Karring T. Role of “diseased” root cementum in healing following treatment of periodontal disease. A clinical study. *J Clin Periodontol* 1988; 15:464-468.

O’Leary TJ, Kafrawy AH. Total cementum removal: a realistic objective? *J Periodontol* 1983; 54:221-226.

Okte E, Unsal B, Bal B, Erdemli E, Akbay A. Histological assessment of root cementum at periodontally healthy and diseased human teeth. *J Oral Sci* 1999; 41(4): 177-80.

Pinheiro ML, Feres-Filho EJ, Graves DT, Takiya CM, Elsas MI, Elsas PP, Luz RA Quantification and localization of platelet-derived growth factor in gingiva of periodontitis patients. J. Periodontol. 2003;74**,** 323.

Rossa C Jr, Marcantonio E Jr, Cirelli JA, Marcantonio RA, Spolidorio LC, Fogo JC. Regeneration of Class III furcation defects with basic fibroblast growth factor (b-FGF) associated with GTR. A descriptive and histometric study in dogs. *J Periodontol* 2000;71(5):775-84.

Ryan PC, Newcomb GM, Seymour GJ, Powell RN. The pulpal response to citric acid in cats. *J Clin Periodontol* 1984 Nov; 11(10): 633-43

Saito M, Handa K, Kiyono T, Hattori S, Yokoi T, Tsubakimoto T, Harada H, Noguchi T, Toyada M, Sato S, Teranaka T. Immortalization of cementoblast progenitor cells with Bmi-1 and TERT. *J Bone Miner Res* 2005; 20:50-7.

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

Saygin NE, Tokiyasu Y, Giannobile WV, Somerman MJ. Growth factors regulate expression of mineral associated genes in cementoblasts. *J Periodontol* 2000; 71:1591-600.

Séguier S, Gogly B, Bodineau A, Godeau G, Brousse N. Is collagen breakdown during periodontitis linked to inflammatory cells and expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gingival tissue?*J Periodontol* 2001;71:1398-1406.

Schroeder HE, Scherle WF. Cemento-enamel junction – revisited. *J Periodontal Res* 1988; 23: 53–59.

Schroeder HE. Handbook of microscopic anatomy. Vol. 5. The periodontium. Berlin: Springer, 1986: 23–119.

Schupbach P, Gaberthuel T, Lutz F, Guggenheim B. Periodontal repair or regeneration: structures of different types of new attachment. *J Periodontal Res* 1993; Jul;28(4):281-93

Selvig KA. Ultrastructural changes in cementum and adjacent connective tissue in periodontal disease. *Acta Odontol Scand* 1966; 24: 459–600.

Shapira L, Houri Y, Barak V, Halabi A, Soskolne WA, Stabholz A. Human monocyte response to cementum extracts from periodontally diseased teeth: effect of conditioning with tetracycline. *J Periodontol* 1996;67(7):682-7.

Silva TA, Lara VS, Rosa AL, Cunha FQ. Cytokine and chemokine response of bone cells after dentin challenge *in vitro*. *Oral Dis* 2004; 10: 258–264.

Silva TA, Lara VS, Silva JS, Garlet GP, Butler WT, Cunha FQ. Dentin Sialoprotein and

Phosphoprotein Induce Neutrophil Recruitment: A Mechanism Dependent on IL-1β, TNF-α, and CXC Chemokines. *Calcif Tissue Int* 2004; 74:532–541.

Silva TA, Rosa AL, Lara VS. Dentin matrix proteins and soluble factors: intrinsic regulatory signals for healing and resorption of dental and periodontal tissues? *Oral Dis* 2004; 10:63-74.

Teitelbaum SL Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 2000; 289:1504-1508.

Teng YTA, Nguyen H, Gao X, Kong YY, Gorczynski RM, Singh B,. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest*. 2000;106:R59-R67.

Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004 Dec;15(6):457-75.

Smart GJ, Wilson M, Davies EH, Kieser JB. The assessment of ultrasonic root surface debridement determination residual endotoxin levels. *J Clin Periodontol* 1990; 17:174-178.

Wallace JA, Bissada NF. Pulpal and root sensitivity rated to periodontal therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990; 69(6): 743-7

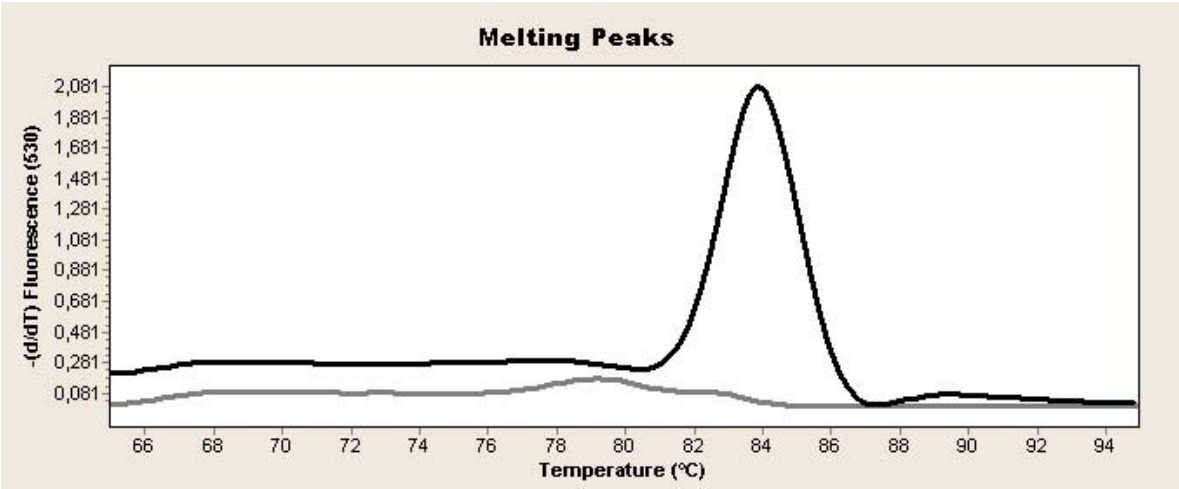
Wilson M, Moore J, Kieser JB. Identity of limulus amoebocyte lysate-active root surface materials from periodontally involved teeth. *J Clin Periodontol* 1986; 13(8): 743-7.

Zhao M, Jin Q, Berry JE, Nociti FH Jr, Giannobile WV, Somerman MJ. Cementoblast delivery for periodontal tissue engineering. *J Periodontol* 2004; 75:154-61.

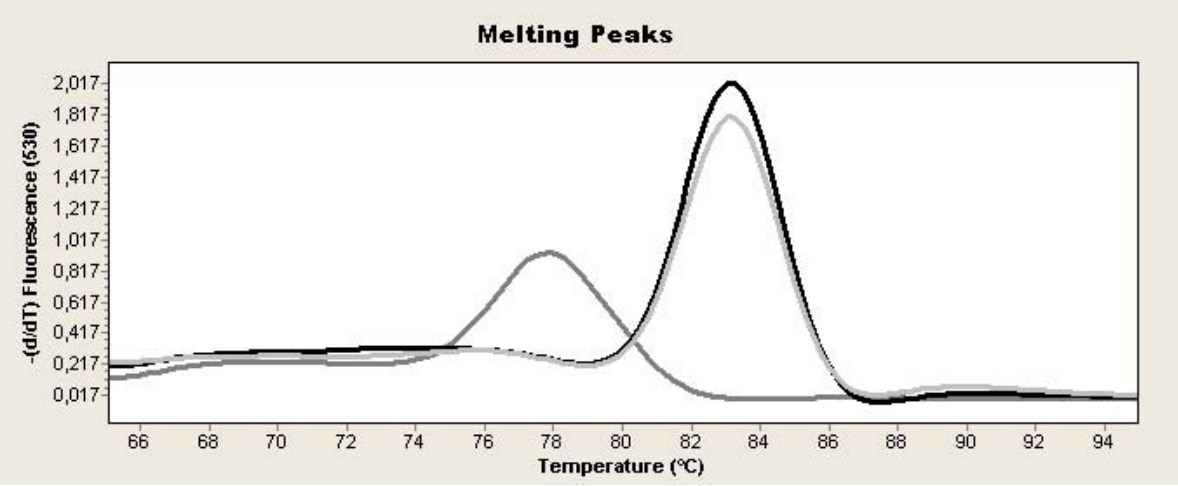
ANEXOS

Gráficos ilustrativos das curvas de melting referentes aos genes já padronizados. Os gráficos ilustram as melhores condições obtidas para cada gene e o seu respectivo controle negativo (água livre de nucleotídeos) – A. OPG, B. RANKL, C. IL-1, D. GAPDH, E. IL-6, F. MMP-2, G. ALP, H. MMP-9, I. Colágeno-I, e J. Colágeno-III.

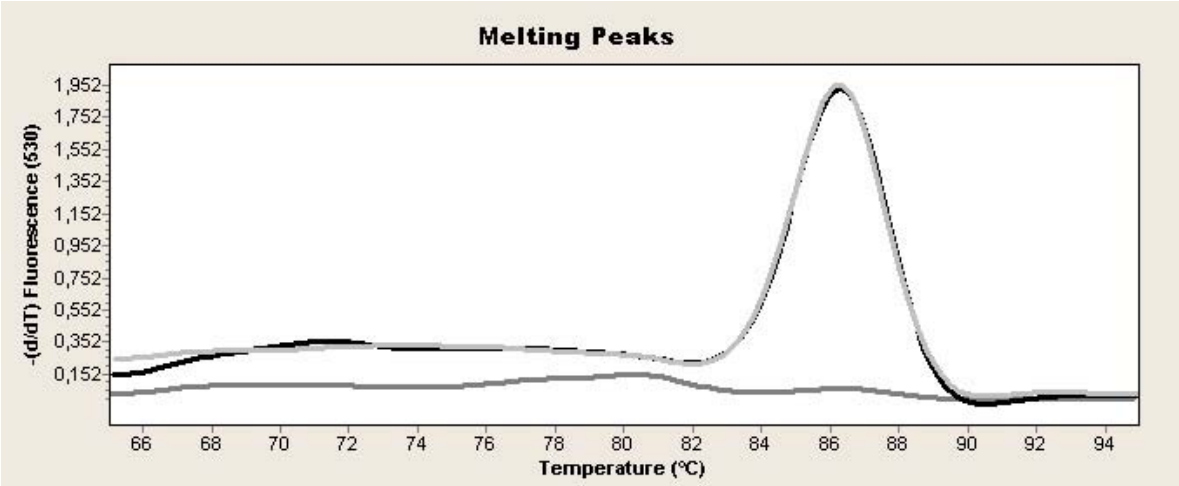
A.



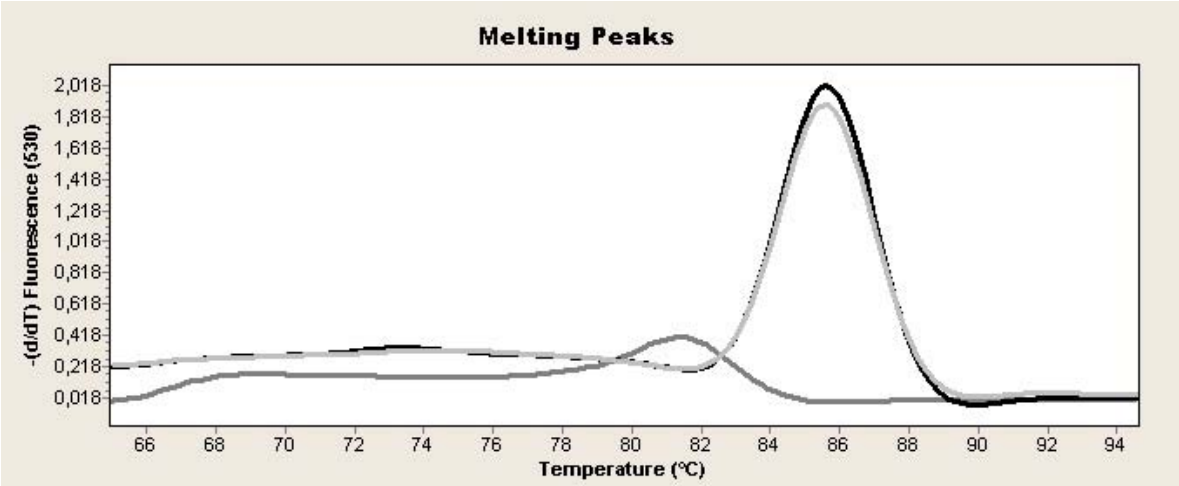
B.



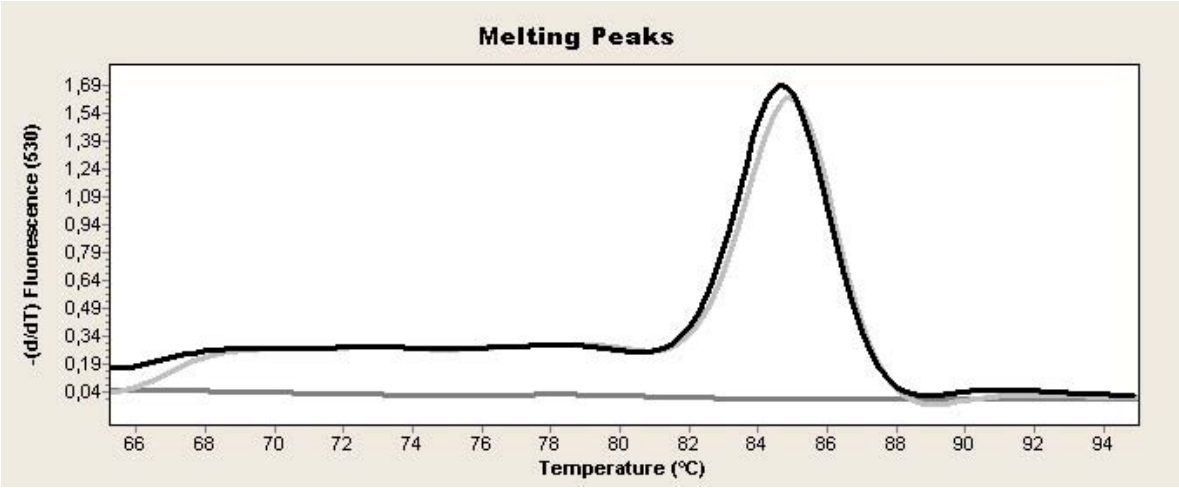
C


Melting Peaks
-(d/dT) Fluorescence (530)
1,952
1,752
1,552
1,352
1,152
0,952
0,752
0,552
0,352
0,152
66 68 70 72 74 76 78 80 82 84 86 88 90 92 94
Temperature (°C)

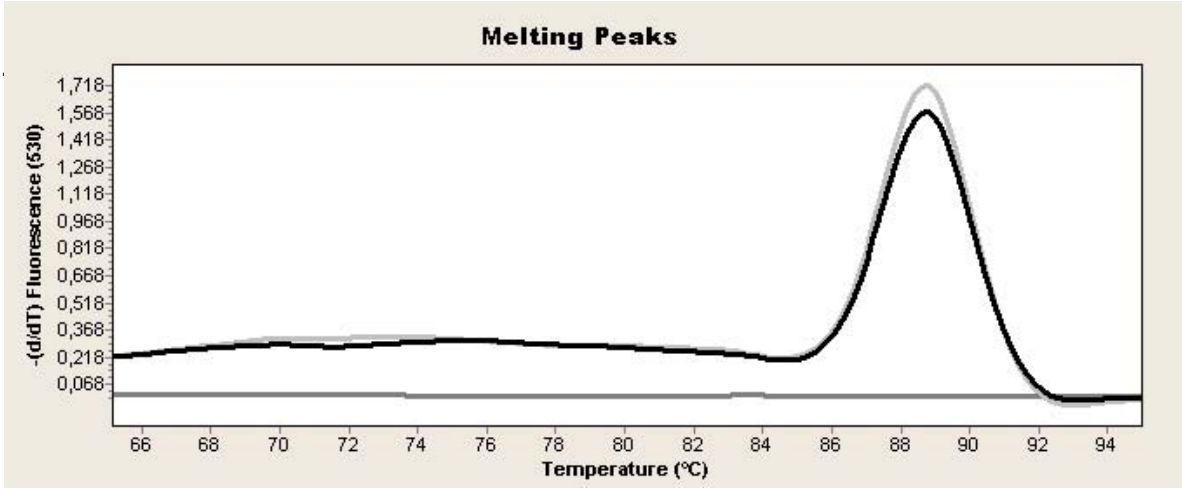
D.


Melting Peaks
-(d/dT) Fluorescence (530)
2,018
1,818
1,618
1,418
1,218
1,018
0,818
0,618
0,418
0,218
0,018
66 68 70 72 74 76 78 80 82 84 86 88 90 92 94
Temperature (°C)

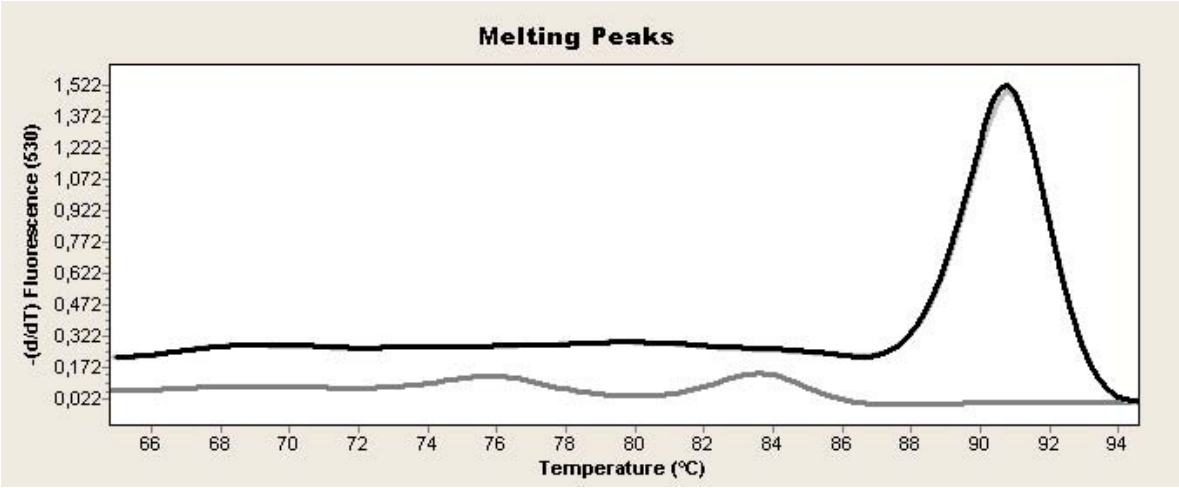
E.


Melting Peaks
-(d/dT) Fluorescence (530)
1,69
1,54
1,39
1,24
1,09
0,94
0,79
0,64
0,49
0,34
0,19
0,04
66 68 70 72 74 76 78 80 82 84 86 88 90 92 94
Temperature (°C)

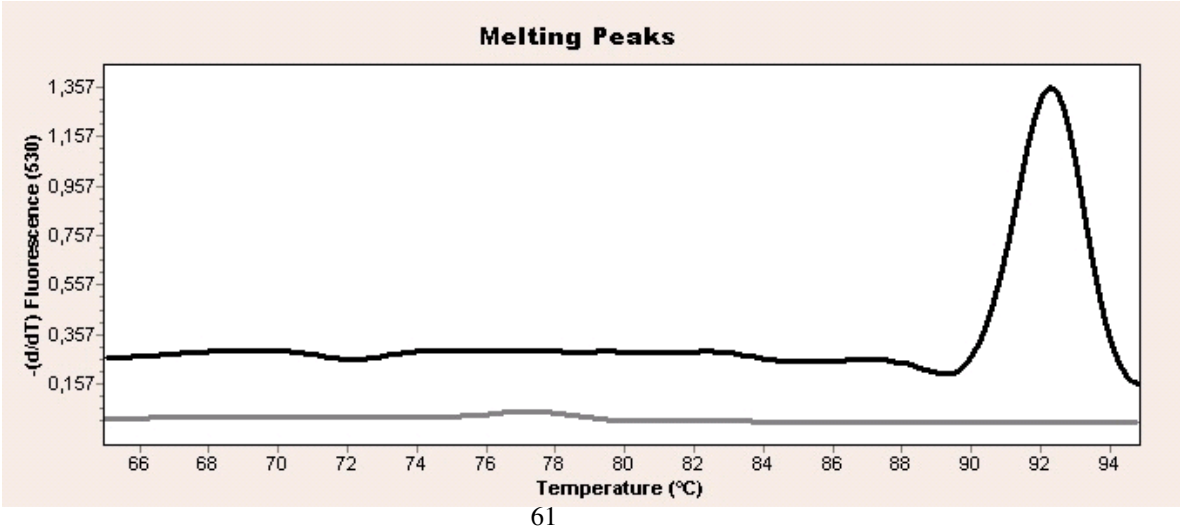
F.


Melting Peaks
-(d/dT) Fluorescence (530)
1,718
1,568
1,418
1,268
1,118
0,968
0,818
0,668
0,518
0,368
0,218
0,068
66 68 70 72 74 76 78 80 82 84 86 88 90 92 94
Temperature (°C)

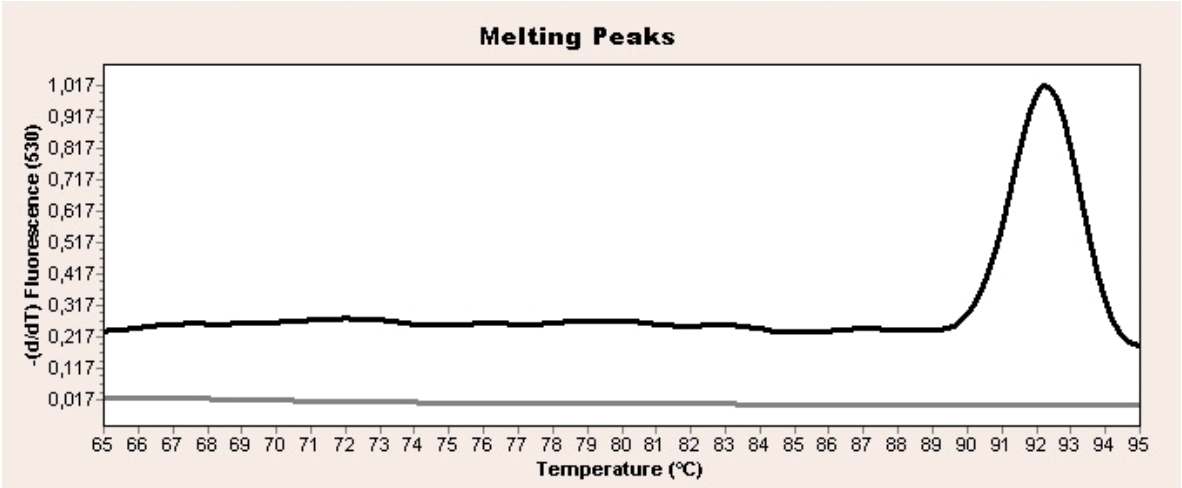
G.


Melting Peaks
-(d/dT) Fluorescence (530)
1,522
1,372
1,222
1,072
0,922
0,772
0,622
0,472
0,322
0,172
0,022
66 68 70 72 74 76 78 80 82 84 86 88 90 92 94
Temperature (°C)

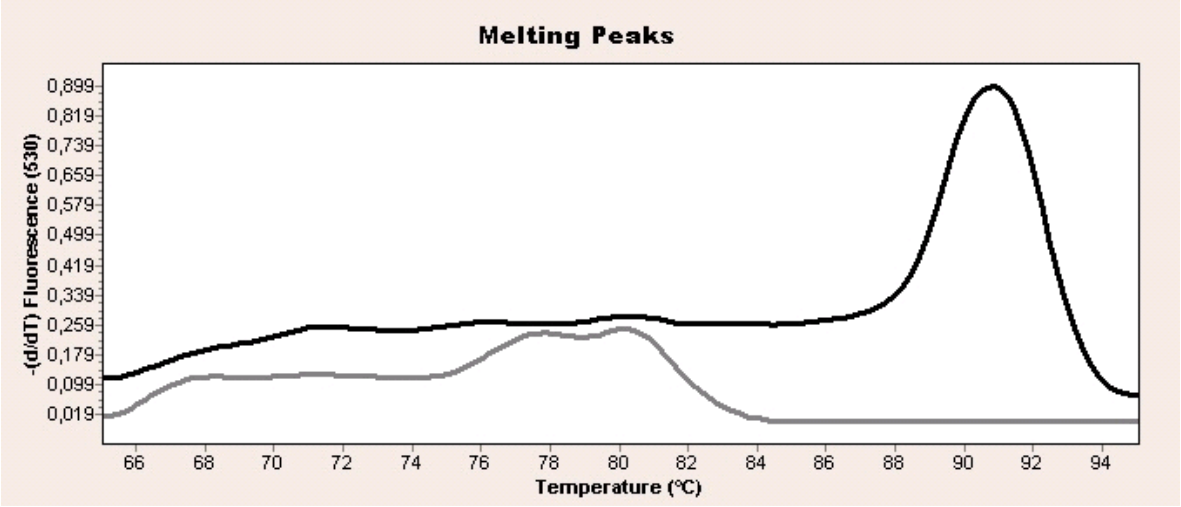
H.


Melting Peaks
-(d/dT) Fluorescence (530)
1,357
1,157
0,957
0,757
0,557
0,357
0,157
66 68 70 72 74 76 78 80 82 84 86 88 90 92 94
Temperature (°C)

I.


Melting Peaks
-(d/dT) Fluorescence (530)
1,017
0,917
0,817
0,717
0,617
0,517
0,417
0,317
0,217
0,117
0,017
65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95
Temperature (°C)

J.


Melting Peaks
-(d/dT) Fluorescence (530)
0,899
0,819
0,739
0,659
0,579
0,499
0,419
0,339
0,259
0,179
0,099
0,019
66 68 70 72 74 76 78 80 82 84 86 88 90 92 94
Temperature (°C)