

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Odontologia



DISSERTAÇÃO

Potencial inflamatório de duas técnicas para afastamento gengival utilizadas durante procedimentos protéticos

Hugo Ramalho Sarmento

HUGO RAMALHO SARMENTO

**POTENCIAL INFLAMATÓRIO DE DUAS TÉCNICAS PARA AFASTAMENTO
GENGIVAL UTILIZADAS DURANTE PROCEDIMENTOS PROTÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Prótese Dentária.

Orientadora: Prof^a Dr^a Fernanda Faot

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Renato Manzolli Leite

Pelotas, 2013

Banca Examinadora:

Profª Drª Fernanda Faot (orientadora)

Profª Drª Adriana Etges

Prof. Dr. Wander José da Silva

Profª Drª Tatiana Pereira Cenci (suplente)

Dedicatória

Dedico a realização deste trabalho:

Aos meus pais, Manoel e Zélia, por todo amor, educação, sabedoria e apoio oferecidos.

Às minhas irmãs Bruna e Emanuelle, que amo intensamente.

À minha esposa Raquel, pelo amor e dedicação incondicional.

Agradecimentos

Aos meu pais, **Manoel** Aminadabe Sarmiento e Maria **Zélia** Ramalho Sarmiento por terem me ofertado todas as ferramentas para que eu pudesse me tornar um homem de bem. Mas muito mais eu tenho a agradecer a **Deus** por ter me concedido pais que me colocaram sempre em primeiro lugar a saúde, educação e bem estar dos seus filhos. Amo muito vocês!

Às minhas irmãs, **Bruna** Ramalho Sarmiento e **Emanuelle** Ramalho Sarmiento, pela infância maravilhosa que tivemos juntos e pelo aprendizado sempre compartilhado um com o outro. Uma de cada maneira teve efetiva responsabilidade na formação do cidadão que sou hoje. Sempre amarei vocês, minhas irmãs!

À minha esposa **Raquel** Venâncio Fernandes Dantas, minha companheira dos momentos felizes, mas principalmente daqueles difíceis, aqueles em que mais precisamos. Você é minha amiga, esposa, família, tudo pra mim! Muito obrigada por me incentivar em tudo que fiz, faço e farei. A motivação que recebo de ti tem grande valia em tudo que realizo. “Te amo como nunca amei ninguém! [...] Você mudou a minha história”.

À minha sogra, **Eunice** Maria Fernandes, que como gosta de falar, cuida de mim como o filho homem que Deus não lhe deu. Fico radiante por ter a oportunidade de preencher este espaço em tua vida!

Ao meu amigo José Severino da Silva, o querido **Zezinho**, por me conceder a honra de ter sua amizade e de sua amada família. Tua amizade é uma joia tão preciosa que não cabe em cofre algum, mas sempre guardarei em meu coração.

À minha cunhada, **Ruth** Venâncio Fernandes Dantas, a quem amo como a uma amiga que aos poucos virou irmã. Obrigado por todos os momentos agradáveis que passamos juntos e por fazer sempre questão de estar presente em minha vida.

A minha **família e amigos** que torcem sempre pelas minhas conquistas.

À minha orientadora, Prof.^a **Fernanda** Faot, pela amizade, pela confiança sempre depositada em mim e por me dar força em todos os “pequenos detalhes” que eu sempre queria adicionar no trabalho. Obrigado também por toda a paciência e generosidade ao compartilhar comigo parte do teu vasto conhecimento clínico.

Ao meu co-orientador, Prof. **Fábio** Renato Manzolli Leite, por toda ajuda, comprometimento, disponibilidade e dedicação. Muito obrigada.

Ao professor **Flávio** Fernando Demarco, que depois de Raquel, é o grande responsável por eu estar aqui hoje, não só no começo, mas também no meio e finalização deste Mestrado. O teu apoio tornou possível passos bastante distantes até então. A família Demarco/Tarquínio estará no meu coração onde quer que eu esteja, para sempre!

Ao professor **Fabrizio** Aulo Ogliari, pelo apoio oferecido, tornando a realização deste trabalho possível, mas principalmente pelo exemplo de pesquisador que és e pela disponibilidade e simpatia, em todos os momentos em que precisei de sua ajuda.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia** da UFPel, meus sinceros agradecimentos pelo acolhimento dos professores, funcionários e colegas. Em especial, quero agradecer à Fernanda Jostmeier e D. Carmem (laboratório de Microbiologia), pela compreensão, atenção e dedicação com que executam seu trabalho.

Ao professor e coordenador do PPGO UFPel, **Maximiliano** Sérgio Cenci, pela atenção, disponibilidade, dedicação e generosidade com que cumpre seu trabalho como educador.

Às professoras da área de concentração em Prótese Dentária, **Luciana** Rezende, **Noéli** Boscato e **Tatiana** Pereira Cenci, por terem feito parte efetiva na minha formação como mestre em Prótese Dentária. Nunca me esquecerei das valiosas discussões e aulas apresentadas nos nossos Tópicos Avançados. As vossas palavras me fizeram refletir e crescer como Mestre que agora sou se direito.

À minha **família de Pelotas**, todos os **amigos** que fiz e que levarei em meu coração, obrigada por terem cruzado meu caminho e por fazer o dia-a-dia muito melhor. Em especial, gostaria de citar os nomes dos amigos (em ordem alfabética): Eliana, Eliseu, Carol Ely, Carol Pinto, Duda, Fernanda Valentini, Gregori, Lísia, Luísa, Mabel, Marcos Brito, Marcus Conde, Renato, Vanessa.

Aos colegas das disciplinas do Mestrado em Prótese Dentária: César, Clarissa, Fernanda Vallentini, Heverson, Mauro, Raissa, Rita, Simone. Obrigado pela convivência agradável e pela troca humilde e generosa de conhecimentos.

A todos que participaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meus agradecimentos mais sinceros.

Notas preliminares

A presente dissertação foi redigida segundo o Manual de Normas para Dissertações, Teses e Trabalhos Científicos da Universidade Federal de Pelotas de 2006, adotando o Nível de Descrição 4 – estrutura em Artigos, que conta no Apêndice D do referido manual. Disponível no endereço eletrônico: http://www.ufpel.tche.br/prg/sisbi/documentos/Manual_normas_UFPel_2006.pdf.

Resumo

SARMENTO, Hugo Ramalho. **Potencial inflamatório de duas técnicas para afastamento gengival utilizadas durante procedimentos protéticos**. 2013. 97f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Este estudo foi composto por duas fases que avaliaram duas técnicas para afastamento gengival (AG), convencional e sem fio: 1- um estudo *in vitro* que avaliou a citotoxicidade/genotoxicidade, e o pH de agentes à base de AlCl_3 ; e 2- um ensaio clínico randomizado que avaliou a eficácia destas técnicas. Na fase *in vitro*, eludatos foram obtidos pela diluição dos eluates agentes à base de AlCl_3 em meio de cultura por 1h, 4h e 24h. Os valores de pH foram aferidos por pHmetro digital, citotoxicidade pelo teste MTT e genotoxicidade pelo teste do Micronúcleo. Um ensaio clínico randomizado, cruzado, duplo-cego foi concebido para avaliar fatores clínicos, imunológicos e individuais antes e após AG por duas técnicas, convencional (C: fio gengival + gel adstringente) e sem fio (SF: pasta à base de adstringente). Estes fatores foram avaliados em incisivos preparados para coroas metalo-cerâmicas antes, 1 dia e 10 dias após AG. As concentrações de Interleucina 1β , Interleucina 6 e Fator de Necrose Tumoral α foram avaliadas no fluido gengival crevicular coletado antes (controle) e 1 dia após AG. Os dados do estudo *in vitro* foram analisados por ANOVA 2-fatores e teste de Tukey. Os dados do ensaio clínico foram analisados por ANOVA para medidas repetidas e teste de Tukey (fator imunológico), teste de Friedman (parâmetros periodontais), e Exato de Fisher ou teste Qui-quadrado (dor, estresse e sabor desagradável). Todos os testes consideraram $p < 0.05$. Os valores médios de pH foram estatisticamente superiores para C que para SF. As técnicas não foram citotóxicas no tempo de 1h. SF foi mais citotóxica que C em 4h e 24h. A genotoxicidade SF foi semelhante à do grupo controle. Nenhuma das técnicas avaliadas resultou em piora nos índices periodontais. A técnica C foi mais estressante

que a SF, e semelhantes considerando dor e sabor desagradável. AG realizado por ambas as técnicas levou a maiores concentrações médias das três citocinas avaliadas. C resultou nos maiores níveis de interleucinas. In vitro, os adstringentes apresentaram atividade biológica aceitável, sem diferença na genotoxicidade entre as técnicas. In vivo, SF foi menos estressante e resultou em menores níveis de citocinas após AG.

Palavras-chave: Prótese Dentária. Prótese Parcial Fixa. Retração Gengival. Compostos de Alumínio. Mediadores da Inflamação.

Abstract

SARMENTO, Hugo Ramalho. **Potencial inflamatório de duas técnicas para afastamento gengival utilizadas durante procedimentos protéticos**. 2013. 97f. Defesa (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

This study was composed by two phases that evaluated two gingival displacement (GD) techniques, conventional and cordless: 1- a in vitro study which assess cytotoxicity/genotoxicity, and pH of AlCl_3 -based agents; and 2- a randomized clinical which evaluated the efficacy of these techniques. For in vitro phase, eluates were obtained by dilution of AlCl_3 -based into culture medium for 1h, 4h, and 24h. pH values were measured by digital pHmeter, cytotoxicity by MTT test and genotoxicity by Micronuclei test. A crossover, double-blind, randomized clinical trial was designed to evaluate clinical, immunologic and individual factors before and after GD by two techniques, conventional (gingival cord + astringent gel) and cordless (astringent-based paste). These factors were evaluated on incisors prepared for metal-ceramic dental crowns before, 1 day post-GD and 10 day post-GD. Interleukin 1β , Interleukin 6 and Tumor Necrosis Factor α concentrations were evaluated on gingival crevicular fluid collected before (control) and 1 day post-GD. In vitro data were analyzed by two-way ANOVA and Tukey test. Clinical data were analyzed by One-way Repeated Measures ANOVA and Tukey test (immunologic factor), Friedman test (periodontal parameters), and Fisher Exact or Qui-square test (pain, stress, and unpleasant flavor during GD). All test were realized considering $p < 0.05$. Mean pH values were statistically higher for Viscostat than Expasyl. Both astringents were non-cytotoxic at 1h. Expasyl was more cytotoxic than Viscostat at 4h and 24h. Expasyl genotoxicity was not different from control group. Neither of the two evaluated techniques resulted in worse periodontal indices. Conventional technique was statistically more stressing than cordless, and similar considering pain and unpleasant taste. GD by the both

treatments evaluated led to statistically higher mean concentrations of the three interleukins evaluated. Conventional GD technique resulted in the highest interleukins levels. In vitro, AlCl₃-based astringents presented acceptable biological activity with no genotoxic difference between Expasyl and control group. In vivo, cordless technique was less stressful and resulted in lower cytokines levels after GD.

Keywords: Dental Prosthesis. Fixed Partial Denture. Gingival Recession. Aluminum Compounds. Inflammation Mediators.

Lista de figuras

Projeto de pesquisa

Figura 1	Esquema ilustrativo de uma placa de 96 poços e a alocação dos grupos, para um mesmo tempo de exposição (3 minutos) (n=5). CP=controle positivo; CN= controle negativo.....	29
Figura 2	Esquema ilustrativo de uma placa de 24 poços e a alocação dos grupos, para um mesmo tempo de exposição (3 minutos) (n=3).....	30
Figura 3	Sistema de afastamento gengival Expasyl®	35
Figura 4	Kit ELISA disponível comercialmente para quantificação de citocinas.....	37

Artigo científico 2

Fig. 1	Flow diagram of the trial.....	80
--------	--------------------------------	----

Lista de tabelas

Projeto de pesquisa

Tabela 1	Materiais utilizados neste estudo assim como seus respectivos fabricantes e descrição do produto.....	25
Tabela 2	Grupos incluídos no estudo, de acordo com o produto testado, a concentração e o tempo de exposição.....	28

Artigo científico 1

Table 1	Materials used in this study and its manufacturers, and compositions.....	54
Table 2	Mean pH $\pm$ standard deviation (SD) for experimental groups.....	55
Table 3	Cellular viability (%) for experimental groups.....	56
Table 4	Number of micronuclei (MN) for experimental and control groups.....	57

Artigo científico 2

Table 1	Subject distribution for periodontal parameters at the three visits for each technique (Cordless, Expasyl; Conventional, Ultrapak Cord + Viscostat Clear).....	75
Tabela 2	Mean ranks of probing depth (PD), gingival index (GI), and plaque index (PI) for the Cordless technique group.....	76
Tabela 3	Mean ranks of probing depth (PD), gingival index (GI), and plaque index (PI) for the Conventional technique group.....	77
Tabela 4	Subjective parameters reported by subjects after gingival displacement.....	78
Tabela 5	Mean interleukin concentration (pg/ μ l) $\pm$ standard deviation (SD) before (control) and after treatments.....	79

Lista de abreviaturas e siglas

%	Percentual
®	Símbolo indicativo de marca registrada
µL	Microlitro, unidade de volume
°C	Graus Celsius, unidade de temperatura
°GL	Graus Gay Lussac
+	Mais, símbolo de adição
cm ²	Centímetro quadrado, unidade de área
et al.	Colaboradores
mm	Milímetro, unidade de medida
mm ²	Milímetro quadrado, unidade de área
CA	Califórnia, estado americano
CDDB	Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca
CN	Controle negativo
CNS	Conselho Nacional de Saúde
Co.	Corporation
CP	Controle positivo
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EUA	Estados Unidos da América
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> , método para detecção de um anticorpo ou de um antígeno em determinada amostra
Fig.	Figura
h	Hora(s)
IG	Índice gengival
IL	Illinois, estado americano

IL-	Interleucina
IP	Índice de placa
Ltda.	Limitada
M	Molar, medida de concentração
mg/mL	Miligramas por mililitro
min	Minuto
mL	Mililitro, unidade de volume
MO	Missouri, estado americano
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio
N	Normal, medida de concentração
NCI	Nível clínico de inserção
nm	Nanometro, unidade de medida
NY	New York, estado americano
PBS	Solução salina fosfatada
PEMA	Polietil-metacrilato
pH	Potencial hidrogeniônico
PS	Profundidade de sondagem
RJ	Rio de Janeiro, estado brasileiro
s	Segundo(s)
SFB	Soro fetal bovino
SP	São Paulo, estado brasileiro
Tab.	Tabela
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
Ui/mL	Unidades internacionais por mililitro
UT	Utah, estado americano
VT	Vermont, estado americano

Sumário

1 Projeto de pesquisa

1.1 Introdução	18
1.2 Justificativa	22
1.3 Objetivos.....	23
1.4 Material e métodos.....	24
1.4.1 Delineamento Experimental.....	24
1.4.2 Material.....	24
1.4.3 Métodos.....	25
1.4.3.1 Etapa <i>In vitro</i>	25
1.4.3.1.1 Aferição do pH	25
1.4.3.1.2 Cultivo celular primário.....	26
1.4.3.1.3 Avaliação da Citotoxicidade.....	27
1.4.3.1.4 Avaliação da genotoxicidade.....	30
1.4.3.2 Etapa clínica.....	32
1.4.3.2.1 Cálculo e seleção amostral.....	32
1.4.3.2.2 Índices periodontais avaliados.....	33
1.4.3.2.3 Preparo coronário e confecção dos provisórios.....	34
1.4.3.2.4 Afastamento gengival e moldagem.....	34
1.4.3.2.5 Avaliação da concentração de Interleucina 1 beta (IL-1 β), Interleucina 6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α).....	36
1.4.3.3 Considerações éticas.....	37
1.4.3.4 Análise dos dados.....	37
Referências.....	39
Orçamento.....	41
Cronograma de execução.....	43

2 Relatório de trabalho de campo.....	45
3 Artigo científico 1.....	47
4 Artigo científico 2.....	59
5 Conclusões.....	81
6 Referências.....	82
Apêndices.....	88
Apêndice 1- Ficha de exame clínico.....	89
Apêndice 2- Termo de consentimento livre e esclarecido.....	95

1 Projeto de pesquisa

1.1 Introdução

Os procedimentos de afastamento da margem gengival são comumente aceitos na prática da Odontologia restauradora moderna. Estes métodos oferecem visibilidade e fácil acesso ao sulco gengival, mantendo-o limpo, seco e criando uma condição adequada para a confecção de restaurações diretas e indiretas (BENNANI; SCHWASS; CHANDLER, 2008). A utilização do afastamento gengival é extremamente importante, independente da técnica de moldagem utilizada (HANSEN; TIRA; BARLOW, 1999; GOLDBERG; HIGGINBOTTOM; WILSON, 2001; DONOVAN; CHEE, 2004; PERAKIS; BELSER; MAGNE, 2004).

De acordo com o Glossário de Termos em Prótese Dentária (2005), o afastamento gengival é definido como a deflexão da margem gengival que circunda o dente. O objetivo do procedimento é criar um suficiente espaço lateral e vertical entre a linha de término do preparo e o tecido gengival, permitindo a inserção de um volume apropriado do material de moldagem no interior do sulco gengival expandido (NEMETZ; DONOVAN; LANDESMAN, 1984; WEIR; WILLIAMS, 1984; BENSON *et al.*, 1986; CASSIDY; GUTTERIDGE, 1994). Em termos subgengivais, a precisão da moldagem depende da exposição das margens do preparo proporcionada pela técnica de afastamento empregada. Os tecidos moles devem ser delicada e atraumaticamente deslocados, voltando à posição original após o procedimento (GOLDBERG; HIGGINBOTTOM; WILSON, 2001).

As técnicas de afastamento gengival podem ser classificadas como mecânica, química ou cirúrgica, sendo frequentemente usadas em combinação. Os fios para afastamento, nas técnicas mecânica ou químico-mecânica, têm sido largamente empregados devido à sua relativa previsibilidade, efetividade e segurança, quando comparados com a curetagem gengival e a eletrocirurgia

(BENSON *et al.*, 1986; HANSEN; TIRA; BARLOW, 1999). No entanto, o uso da técnica mecânica por meio de fios para afastamento gengival pode ser de difícil execução, consumindo muito tempo clínico e causando sangramento gengival, desconforto para o paciente, podendo levar à recessão gengival (FENG *et al.*, 2006).

Os agentes de afastamento gengival, que podem vir impregnados nos fios ou separadamente, são utilizados na prática clínica na forma de fluidos ou géis. Em relação ao efeito farmacológico da substância ativa, podem ser agrupados em vasoconstritores adrenérgicos e hemostáticos adstringentes (CSILLAG *et al.*, 2007). Dentre os adstringentes, destacam-se os à base de cloreto de alumínio, sulfato de alumínio e sulfato férrico, sendo o cloreto de alumínio o mais largamente empregado, principalmente pela sua baixa toxicidade quando comparados àqueles (NOWAKOWSKA *et al.*, 2010). Os adstringentes apresentam apenas ação local, e isso representa uma vantagem quando estes são comparados aos vasoconstritores adrenérgicos, como a epinefrina, que apresentam ação sistêmica, o que limita sua indicação clínica (POLAT; OZDEMIR; TURGUT, 2007).

Em estudos clínicos, a efetividade dos adstringentes tem sido avaliada positivamente (YANG *et al.*, 2005; KUMBULOGLU *et al.*, 2007; AL HAMAD *et al.*, 2008). Por outro lado, observações *in vivo* (KOPAC; CVETKO; MARION, 2002; AKCA *et al.*, 2006) ou *in vitro* (KOPAC *et al.*, 2002; KOPAC; STERLE; MARION, 2002) têm demonstrado que estes produtos podem induzir efeitos indesejáveis nos tecidos da margem gengival. Isto pode ser explicado pelo relativamente alto nível de acidez encontrado nos adstringentes disponíveis comercialmente, com suas concentrações originais apresentando pH entre 1 e 3 (WOODY; MILLER; STAFFANOU, 1993; AYO-YUSUF; DRIESSEN; BOTHA, 2005; NOWAKOWSKA *et al.*, 2010).

Recentemente, técnicas que dispensam o uso de fios para afastamento gengival têm sido introduzidas com a promessa de muitas vantagens, como redução do tempo clínico gasto e maior conforto ao paciente, sendo minimamente invasivas. Nessa linha tem-se, por exemplo, o Expasyl® (Kerr Corporation, Orange, CA, USA), um material para afastamento gengival com consistência de pasta que associa as propriedades hemostáticas do cloreto de alumínio à expansão higroscópica do caulin¹, que ocorre em contato com o fluido crevicular. Este material oferece um

¹Substância argilosa friável e refratária que serve para o fabrico de porcelana; argila branca.

moderado deslocamento da gengiva em torno de 2 minutos após sua aplicação (PERAKIS; BELSER; MAGNE, 2004).

Um estudo clínico avaliou os efeitos de duas técnicas de afastamento gengival livres de fio, uma contendo cloreto de alumínio (Expasyl®) e outra por meio de um material elastomérico (Korlex-GR®, Biotech-one, San-Chung, Taiwan), comparadas à técnica convencional à base de fios retratores. Os produtos foram avaliados quanto à eficiência do afastamento gengival, potencial de causar recessão gengival após 14 dias, assim como quanto ao desconforto gerado ao paciente durante o afastamento. As três técnicas não diferiram quanto ao potencial de afastamento. No entanto, a técnica convencional causou uma recessão gengival maior quando comparada às demais avaliadas. A recessão causada pelos materiais Expasyl® e Korlex-GR® foi clinicamente insignificante. Além disso, a técnica convencional ainda foi a responsável por causar mais dor aos indivíduos (YANG *et al.*, 2005).

Outro estudo *in vivo* procurou comparar novamente o Expasyl® e outro produto para afastamento gengival elastomérico (Magic Foam Cord®, Coltene Whaledent AG, Altstatten, Suíça) à técnica convencional. Foi observado que todos os métodos avaliados causaram uma inflamação gengival temporária, sendo maior quando utilizado o Expasyl®. Além disso, os tecidos gengivais apresentaram recuperação mais lenta quando utilizado este produto. Por outro lado, apenas as técnicas que dispensam o uso de fios não induziram sangramento durante ou após os procedimentos de afastamento gengival (AL HAMAD *et al.*, 2008).

No entanto, os resultados destes estudos *in vivo* não podem ser diretamente extrapolados para a prática clínica, pois as técnicas de afastamento gengival foram aplicadas em dentes hígidos. A maioria dos trabalhos publicados na literatura sobre técnicas de afastamento gengival livres de fio retrator são demonstrações do uso clínico. Assim, os reais efeitos biológicos deste tipo de técnica no tecido gengival e periodontal não têm sido bem documentados.

Vários estudos tem avaliado a concentração de Interleucinas inflamatórias no fluido gengival. Essas avaliações têm sido realizadas após instalação de aparelhos ortodônticos (UEMATSU; MOGI; DEGUCHI, 1996; IWASAKI *et al.*, 2001), mediante a administração de antimicrobiano (HO *et al.*, 2010), em indivíduos com periodontite agressiva localizada (SHADDOX *et al.*, 2011), com hiperplasia gengival durante o tratamento ortodôntico (GONG; LU; DING, 2011) e em crianças obesas,

com o objetivo de relacionar este quadro com a concentração de TNF- α encontrado no fluido gengival (KHOSRAVI *et al.*, 2009). No entanto, não há estudos disponíveis na literatura avaliando a concentração de citocinas inflamatórias após a aplicação de técnicas para afastamento gengival.

Durante os procedimentos de afastamento gengival para fins protéticos, além do trauma mecânico, a ação de agentes químicos pode induzir uma resposta inflamatória no tecido gengival (KOPAC; CVETKO; MARION, 2002). Essa resposta inflamatória é mediada por citocinas, liberadas por fibroblastos e células inflamatórias – macrófagos e neutrófilos – (GUSTAFSSON *et al.*, 2006). Na presença de inflamação, o fluido gengival apresenta um volume relativamente alto, devido à presença do exsudato inflamatório (HO *et al.*, 2010). Entre as citocinas envolvidas na resposta inflamatória, destacam-se a Interleucina 1 (IL-1), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 18 (IL-18) e o Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) (HAVEMOSE-POULSEN; HOLMSTRUP, 1997; GRAVES, 2008). Como a IL-1, IL-6 e TNF- α são produtos da imunidade inata, estas são as primeiras citocinas produzidas pelo sistema imunológico quando ocorre uma agressão tecidual (GARLET, 2010).

1.2 Justificativa

Este trabalho possibilitará uma comparação entre dois produtos comerciais, utilizados em duas técnicas para afastamento gengival distintas: com ou sem fio retrator. Os resultados permitirão definir qual a técnica menos danosa aos tecidos periodontais, seja em termos de estímulo da resposta inflamatória ou alterações celulares. Além disso, por se tratar de um estudo que envolve etapas clínicas, avaliando a concentração de interleucinas inflamatórias no fluido gengival após a aplicação de produtos para afastamento gengival, oferecerá evidências científicas consistentes e inéditas quanto ao tema estudado.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo Geral

Investigar a influência de duas técnicas de afastamento gengival, com e sem o uso de fio retrator, através da análise da biocompatibilidade *in vitro* e, posteriormente, da resposta inflamatória gengival *in vivo*.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o pH dos agentes de afastamento gengival;
- Avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade dos agentes de afastamento gengival mediante fibroblastos gengivais humanos;
- Avaliar, *in vitro*, a genotoxicidade dos agentes de afastamento gengival;
- Avaliar, *in vivo*, a intensidade da resposta inflamatória após afastamento gengival realizada com os agentes estudados.

1.4 Material e Métodos

1.4.1 Delineamento Experimental

Este estudo incluirá 2 etapas de testes, uma *in vitro* e a seguir, *in vivo*. A primeira etapa consistirá na realização de testes para caracterização do perfil físico e biológico dos materiais de afastamento gengival: avaliação do pH, citotoxicidade e genotoxicidade.

O estudo *in vivo*, um ensaio clínico randomizado, do tipo boca dividida, triplo-cego, preconizará a seleção de 11 pacientes periodontalmente saudáveis com necessidade de reabilitação oral através da confecção de 2 coroas unitárias. Estes pacientes, ao serem moldados, serão submetidos a duas técnicas de afastamento gengival distintas: uma livre de fio retrator (pasta) e outra com a presença de fio retrator (gel + fio). Como variável resposta à reação inflamatória local no momento da moldagem, será adotada a avaliação da atividade/concentração das seguintes citocinas inflamatórias: Interleucina1 (IL-1 β), Interleucina 6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α). Parâmetros clínicos como profundidade de sondagem (PS), nível clínico de inserção (NCI), índice de sangramento gengival (ISG), índice de placa visível (IPV) e a mobilidade dentária serão registrados para os dentes submetidos ao afastamento gengival antes e após o mesmo.

1.4.2 Material

Os materiais utilizados neste estudo, assim como seus fabricantes e sua descrição estão apresentados na Tab. 1.

Tabela 1. Materiais utilizados neste estudo assim como seus respectivos fabricantes e descrição do produto.

Material	Fabricante	Descrição
Expasyl®	Kerr Corporation (Orange, CA, EUA)	Agente de afastamento gengival à base de Cloreto de Alumínio (15%)
Viscostat® Clear	Ultradent Products (South Jordan, UT, EUA)	Agente de afastamento gengival à base de Cloreto de Alumínio (25%)
Ultrapak®	Ultradent Products (South Jordan, UT, EUA)	Fio de afastamento gengival de algodão não-impregnado
Express XT® Denso	3M ESPE (St. Paul, MN, EUA)	Silicone denso com polimerização por reação de adição
Express XT® Fluido	3M ESPE (St. Paul, MN, EUA)	Silicone fluido com polimerização por reação de adição
TRIM II®	Bossworth Company (Skokie, IL, EUA)	Resina acrílica para provisórios à base de polietil-metacrilato (PEMA)

1.4.3 Métodos

O presente estudo será realizado nas instalações da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, sendo a etapa *in vivo* executada na Clínica de Prótese Dentária e a etapa *in vitro*, no Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca (CDDDB).

1.4.3.1 Etapa *In vitro*

1.4.3.1.1 Aferição do pH

Os dois produtos para afastamento gengival estudados serão diluídos em Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (SIGMA Chemical Co., St Louis - MO, EUA) em três concentrações, 1:1, 1:10 e 1:20 (NOWAKOWSKA *et al.*, 2010), totalizando 6 grupos (n=5). Para avaliação dos valores de pH, em pHmetro digital (Quimis, Diadema - SP, Brasil), 1mL de cada uma das concentrações será pipetada em tubos do tipo ependorf. Soluções de referência com valor de pH 1 e 4 serão usadas para calibração do eletrodo.

1.4.3.1.2 Cultivo celular primário

As culturas celulares de fibroblastos gengivais humanos serão obtidas a partir de biópsias da gengiva de pacientes jovens, não-fumantes e com saúde periodontal durante procedimentos de extração de terceiros molares, realizada por motivos ortodônticos. Após a coleta, os tecidos gengivais serão armazenados em DMEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas - SP, Brasil) e 1% de antibiótico (10.000 Ui/mL de penicilina G e 10.000 mg/mL de estreptomicina, Gibco Laboratories Incorporated, Grand Island - NY, EUA).

As peças serão transportadas sob refrigeração e, em capela de fluxo laminar vertical, os tecidos gengivais serão lavados por duas vezes em PBS (Solução salina fosfatada) (SIGMA Chemical Co., St Louis - MO, EUA) e cortados sobre uma placa de Petri esteril, com o auxílio de lâminas de bisturi, até a obtenção de pequenos fragmentos com volume aproximado de 1mm^2 (*explants*). Então, os fragmentos gengivais serão transportados cuidadosamente a uma superfície cultivável de uma garrafa de cultura com superfície cultivável de 25 cm^2 , onde o amassamento do tecido será realizado na superfície da garrafa. Em seguida, será adicionado 1 ml de meio de cultivo enriquecido (DMEM + 10% de SFB + 1% de antibiótico) para promoção da adesão dos *explants* nas garrafas de cultivo. As garrafas serão mantidas uma atmosfera úmida a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 5% CO_2 por 72 h, sem que haja movimentação do recipiente.

Após 72 h, as garrafas serão monitoradas diariamente, em microscópio de luz invertida, para a observação da migração das células a partir dos *explants* de tecido gengival. A cada 48h, 1 mL de DMEM enriquecido com SFB será adicionado cuidadosamente e os fragmentos não aderidos, removidos. Após o início da migração das células, os *explants* serão descartados e as células mantidas até que ocorra a confluência na garrafa, sempre em atmosfera de 5% CO₂ a 37°C.

O crescimento celular isolado será monitorado diariamente em microscópio de luz invertida e o meio de cultura trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular, até a obtenção da subconfluência. Para a realização dos experimentos, as células serão removidas das garrafas de cultivo por tripsinização (0,25% Tripsina-EDTA, Sigma Chemical Co., St Louis - MO, EUA).

1.4.3.1.3 Avaliação da Citotoxicidade

O ensaio colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio, Sigma Chemical Co., St Louis - MO, EUA) será utilizado para avaliar a citotoxicidade dos produtos para afastamento gengival. Os fibroblastos gengivais humanos serão semeados em placas de 96 poços em uma concentração de 5×10^3 células por poço.

Para o teste, as células serão expostas aos dois produtos avaliados, em três diluições em DMEM (1:1, 1:10 e 1:20), em quatro tempos diferentes: 3, 5 e 10 minutos e 24 h (NOWAKOWSKA *et al.*, 2010) (Tab. 2). Durante a exposição, a placa será mantida em ambiente com 5% de CO₂ a 37°C.

Tabela 2. Grupos incluídos no estudo, de acordo com o produto testado, a concentração e o tempo de exposição.

Grupo	Concentração	Produto	Tempo
E1.3	1:1	Expasyl® Viscostat® Clear	3 minutos
E10.3	1:10		
E20.3	1:20		
V1.3	1:1		
V10.3	1:10		
V20.3	1:20		
E1.5	1:1	Expasyl® Viscostat® Clear	5 minutos
E10.5	1:10		
E20.5	1:20		
V1.5	1:1		
V10.5	1:10		
V20.5	1:20		
E1.10	1:1	Expasyl® Viscostat® Clear	10 minutos
E10.10	1:10		
E20.10	1:20		
V1.10	1:1		
V10.10	1:10		
V20.10	1:20		
E1.24	1:1	Expasyl®	24 horas
E10.24	1:10		
E20.24	1:20		
V1.24	1:1		
V10.24	1:10		
V20.24	1:20		

Os meios incubados com cada material, para cada tempo de exposição, irão preencher cinco poços de uma placa de cultivo (200 µL cada) de 96 poços. Desta forma, serão utilizadas quatro placas, uma para cada tempo de exposição. Em cada placa serão incluídos um controle positivo (poços com células e DMEM, mas sem produto para afastamento) e um controle negativo (poços sem células, somente com DMEM) (Fig. 1).

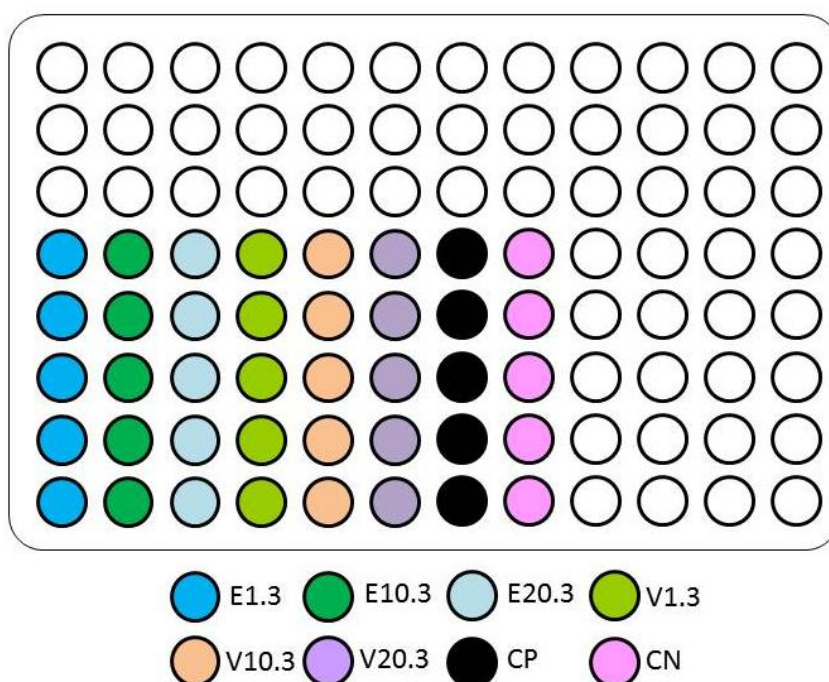


Figura 1. Esquema ilustrativo de uma placa de 96 poços e a alocação dos grupos, para um mesmo tempo de exposição (3 minutos) (n=5). CP=controle positivo; CN= controle negativo.

Após os períodos de exposição, o eludato será sugado, as células serão lavadas duas vezes em PBS e cada poço receberá 200µL de solução de MTT (2mg/mL de DMEM). Em seguida, a placa será incubada por 24h, de forma a permitir o metabolismo do MTT. Após o período, a solução de MTT será sugada e o formazan ressuspendido em 200µL de dimetil sulfóxido (DMSO).

Os resultados serão avaliados por meio de espectrofotometria em Leitor Universal de ELISA (Universal Microplate Reader, ELX 800, BIO-TEK Instruments, Winooski - VT, EUA), em um comprimento de onda de 540 nm, onde serão considerados os valores de absorbância como indicador da viabilidade celular. Os resultados serão expressos como a porcentagem de células viáveis em comparação com as células controle não-expostas.

1.4.3.1.4 Avaliação da genotoxicidade

Para avaliação da genotoxicidade dos produtos para afastamento gengival, serão utilizados fibroblastos de camundongo de uma linhagem celular imortalizada (3T3), cultivados e mantidos em condições propícias para um crescimento em subconfluência. O cultivo será realizado por 5 dias, até que haja um crescimento exponencial e as células possam ser expostas aos produtos testados. Então, os fibroblastos serão liberados da garrafa, como descrito anteriormente, e um volume de 5 mL de meio enriquecido com SFB será acrescido ao volume celular.

Após, lamínulas circulares (13 mm de diâmetro) serão colocadas dentro de cada poço de uma placa de 24 poços, com auxílio de uma pinça estéril. A contagem de fibroblastos será realizada e 3×10^4 células serão transferidas para cada poço, sobre as lamínulas. Posteriormente, a placa será incubada em estufa (37°C, 5% CO₂) por 24h, para que ocorra aderência dos fibroblastos às lamínulas. Após esse intervalo, o meio será removido e 400µL dos produtos-teste será acrescido em cada poço, de acordo com a distribuição ilustrada na Fig. 2. Os tempos de exposição aos produtos para afastamento serão os mesmos utilizados na avaliação da citotoxicidade.

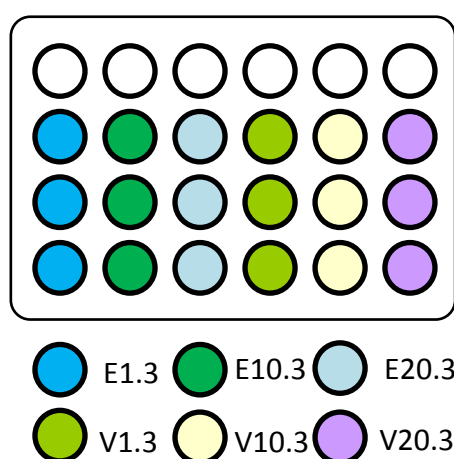


Figura 2. Esquema ilustrativo de uma placa de 24 poços e a alocação dos grupos, para um mesmo tempo de exposição (3 minutos) (n=3).

Então, as células serão fixadas em solução de metanol e ácido acético (3:1) e, posteriormente, as lâminas serão coradas pela Técnica de Feulgen, que consiste na lise das células, por meio da oxidação em solução de ácido clorídrico (1N) e posterior coloração com reagente de Schiff e corante Fast Green. Para tanto, cada lâmina será imersa três vezes em solução de ácido clorídrico (1N) e lavadas por duas vezes, em água destilada.

Depois de secas, as lâminas serão coradas pelo reagente de Schiff, ficando imersas por 2 horas e 30 minutos à temperatura ambiente, protegidas da luz. Logo após, o reagente será removido das lâminas e estas cobertas por água tamponada durante 1 minuto. As lâminas voltarão a ser lavadas em água destilada e um período de 24h será aguardado para que ocorra a secagem. No dia subsequente, as lâminas serão mergulhadas no corante Fast Green por 10 segundos, e depois lavadas em álcool metílico 96°GL, com imersões de 3 segundos. Mais um período de 24 horas é aguardado para que as lâminas sequem e, secas, estas serão fixadas e identificadas em lâminas histológicas.

Antes do início da contagem de micronúcleos, as lâminas serão codificadas para o cegamento do avaliador. Os micronúcleos serão visualizados em microscópio óptico comum (Olympus CX2, Olympus Optical do Brasil Ltda., São Paulo - SP, Brasil), com objetiva de 40x e oculares de 10x. A proporção de micronúcleos será obtida mediante a contagem manual de células micronucleadas, em 1000 células por lamínula.

Os critérios utilizados para identificação de micronúcleos serão os descritos por Countryman e Heddle (1976), com os mesmos apresentando contorno regular, redondo ou oval, e estar dentro do citoplasma da célula. Além disso, os micronúcleos deverão estar no mesmo plano focal e apresentar uma cor semelhante ao núcleo principal, apresentando diâmetro menor que 1/3 do diâmetro do núcleo principal e se encontrar marginalmente ou justaposto ao mesmo.

1.4.3.2 Etapa clínica

1.4.3.2.1 Cálculo e seleção amostral

O cálculo amostral do número de indivíduos a serem incluídos nesta etapa do estudo foi realizado mediante teste *t*, utilizando o pacote estatístico SigmaStat® (Versão 3.5 for Windows®, Systat Software Incorporation, San Jose - CA, EUA). Com base no estudo de Passariello *et. al.* (2011), foram empregados os seguintes valores para o cálculo amostral:

- Menor diferença esperada entre as médias: 4,5;
- Desvio-padrão esperado: 2,5;
- Poder desejado: 0,9;
- Erro tipo α : 0,05.

Com base nestes dados, foi obtido um tamanho amostral de 8 observações por grupo. O equivalente a 30% da amostra será acrescido devido a possíveis perdas durante o estudo, chegando a um total de 11 observações por grupo.

Serão incluídos no estudo 11 voluntários com idade entre 20 e 50 anos que apresentem dois dentes anteriores com necessidade de reconstrução coronária por meio de coroas protéticas unitárias, sendo que estes pacientes devem apresentar pelo menos outro dente que não necessite de tratamento clínico entre eles. Visando eliminar possíveis fatores de confusão, os indivíduos, para serem incluídos no estudo, deverão ser não-fumantes ou ex-fumantes há mais de 5 anos; não terem feito uso de antibióticos nos últimos 60 dias e anti-inflamatórios nos últimos 7 dias; não serem portadores de desordens sistêmicas que predisponham a infecções; se do sexo feminino, não estarem grávidas ou lactantes.

Nos indivíduos incluídos no estudo, os dentes selecionados deverão apresentar saúde periodontal, margem gengival não apresentar-se muito irregular e pelo menos 2mm de gengiva inserida, tecidos gengivais não-fibróticos, sem recessão, profundidade de sondagem ≤ 3 mm, sem evidência de perda significativa de inserção óssea e apresentar ausência de sangramento gengival e placa visível (AINAMO; BAY, 1975). Com o objetivo de garantir o cumprimento dos parâmetros descritos, os pacientes que apresentarem retenção de cálculo dentário e gengivite

serão submetidos ao tratamento periodontal 30 dias antes do início do experimento, para posteriormente serem avaliados quanto à possibilidade de inclusão no estudo.

Para registro dos parâmetros clínicos e índices periodontais avaliados, será utilizada uma ficha clínica padronizada (Apêndice 1). Todos os indivíduos que responderem aos critérios de inclusão deste estudo serão convidados a serem voluntários do mesmo e sua aceitação será confirmada com a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 2) em duas vias, sendo uma entregue ao voluntário e a outra arquivada.

1.4.3.2.2 Índices periodontais avaliados

A profundidade de sondagem (PS), o nível clínico de inserção (NCI), índice de sangramento gengival (ISG), o índice de placa visível (IPV) e a mobilidade dentária serão registrados em todos os dentes ântero-superiores dos voluntários antes de o afastamento gengival ser iniciado (AINAMO; BAY, 1975). A sondagem periodontal será realizada com sonda Williams, que apresenta marcações localizadas a 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9 e 10 mm da ponta do instrumento. Cada medida será arredondada para o menor comprimento. A mensuração clínica de perda de inserção será registrada como a distância entre a junção cimento-esmalte e o fundo do sulco. O sangramento será avaliado em até 15 segundos após a sondagem.

Para calibração, um estudo piloto será realizado. Neste, um periodontista experiente (padrão ouro), após orientar etapa de treinamento com o avaliador, fará o registro dos parâmetros avaliados em um quadrante, randomicamente selecionado, de quatro indivíduos. Então, o avaliador repetirá as medidas 30 minutos após. Uma semana após o treinamento, o avaliador fará uma nova avaliação dos índices clínicos dos mesmos quatro indivíduos. A concordância intra-examinador será avaliada por meio do índice Kappa.

1.4.3.2.3 Preparo coronário e confecção dos provisórios

Os dentes serão preparados convencionalmente com pontas diamantadas 4138, 3168 e 3203 (KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil), com término 1 mm subgengival, para a confecção de coroas totais *metal free*. Em seguida, na mesma sessão clínica, serão confeccionadas restaurações provisórias com resina acrílica à base de PEMA (TRIM II[®]). Este material apresenta baixa irritação tecidual e polimerização rápida, com exotermia consideravelmente inferior às resinas convencionais para a mesma finalidade.

1.4.3.2.4 Afastamento gengival e moldagem

Para controle do biofilme nos voluntários do estudo, quatro dias após o preparo e confecção dos provisórios, será realizada uma profilaxia com pedrapomes e taça de borracha em todos os dentes de cada voluntário. Decorridos sete dias após o preparo coronário, as restaurações provisórias serão removidas. Então, será coletado o material do sulco gengival de um dos dentes a serem reabilitados, selecionados aleatoriamente, mediante sorteio com auxílio de envelopes pardos, para constituir o grupo controle. A placa supragengival será removida cuidadosamente por meio de cureta periodontal, sendo o dente levemente seco com um jato de ar. A coleta do grupo controle, com tiras de papel absorvente estéril (Periopaper[®], Oraflow Incorporated, Amityville - NY, EUA), será realizada antes da aplicação dos agentes retratores. A tira de papel penetrará 1 mm dentro do sulco gengival em sua face vestibular por mesial e permanecerá neste por 60s. Após 90s, uma nova tira de papel será inserida no sulco gengival vestibular por distal e uma segunda coleta será realizada. As duas tiras de papel absorvente com o material coletado serão armazenados em um criotubo identificado por um código conhecido apenas por um terceiro pesquisador. No criotubo serão adicionados 100 µL de PBS e este tubo será centrifugado sendo apenas o sobrenadante congelado a -80°C, até a análise laboratorial (MIRANDA *et al.*, 2006). Após, os dentes receberão afastamento gengival com os produtos avaliados neste estudo.

As seguintes técnicas de afastamento gengival serão utilizadas, de acordo com a indicação dos fabricantes: pasta de afastamento gengival Expasyl® (Kerr Corporation) (Fig. 3) e gel para afastamento gengival Viscostat® Clear (Ultradent Products) associado ao uso de fio retrator (Ultrapak®). Em cada um dos dois dentes não-vizinhos será aplicada aleatoriamente, por meio de sorteio com auxílio de envelopes pardos, uma técnica de afastamento. A sequência de aplicação será escolhida levando-se em consideração o tempo recomendado para cada técnica. Para ambos os produtos, será utilizado o tempo de afastamento máximo indicado pelo respectivo fabricante: 5 minutos (Viscostat® Clear) seguido de 10 minutos para o fio de retração, para a técnica convencional; 2 minutos para a técnica livre de fios (Expasyl®). Então, os agentes de afastamento serão removidos da margem gengival, que será lavada abundantemente e seca. A etapa de moldagem será realizada utilizando-se um material à base de silicone com polimerização por reação de adição (Express XT®, 3M ESPE). Será utilizada a técnica de dupla moldagem e os modelos serão vazados uma hora após a impressão para que sejam evitadas bolhas devido à liberação de hidrogênio durante a polimerização do material.

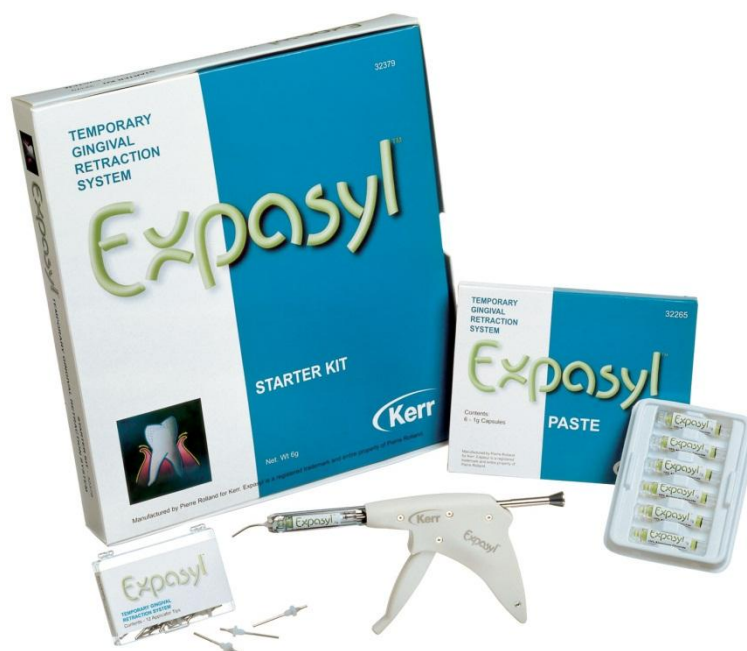


Figura 3. Sistema de afastamento gengival Expasyl®.

Passadas 24h após a etapa de afastamento gengival, uma nova coleta de material proveniente do sulco gengival será realizada, desta vez em ambos os dentes que receberam as técnicas de afastamento gengival, para composição dos grupos experimentais. Para esta coleta, serão seguidos os mesmos princípios já descritos anteriormente. Todos os índices periodontais serão reavaliados no segundo e no sétimo dia após os procedimentos de afastamento gengival por um avaliador cego em relação à técnica de afastamento gengival empregada, em cada um dos dentes que recebeu afastamento gengival, com o objetivo de avaliar alterações nos parâmetros clínicos causados por tal procedimento.

1.4.3.2.5 Avaliação da concentração de Interleucina 1 beta (IL-1 β), Interleucina 6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α)

O material coletado e preparado será removido de ambiente refrigerado a -80°C por um avaliador cego quanto à técnica de afastamento gengival empregada para o dente em que o material foi coletado. Este material coletado de cada dente será pipetado em um poço de uma placa de 96 poços. As concentrações das citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) no fluido gengival serão quantificadas utilizando-se *kits* ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) específicos para cada citocina, de acordo com as recomendações do fabricante (Invitrogen Corporation, Carlsbad - CA, EUA) (Fig. 4).



Figura 4. Kit ELISA disponível comercialmente para quantificação de citocinas.

1.4.3.3 Considerações éticas

Para a execução do presente estudo, serão observados e obedecidos todos os aspectos éticos prescritos na Resolução 196/96, do Conselho Nacional de Saúde (CNS), que versa sobre a ética em pesquisa envolvendo seres humanos e materiais derivados destes.

O referido projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas e aprovado sob protocolo número 54/2011. Todos os voluntários participantes deste estudo serão beneficiados pela reabilitação de elementos dentários com necessidades protéticas, sem custos financeiros.

1.4.3.4 Análise dos dados

Após a coleta, os dados serão digitados em um banco a ser criado no programa Excel® (Versão 2010 for Windows®, Microsoft Corporation, Redmond - CA, EUA) e posteriormente transferidos ao pacote estatístico SigmaStat®.

Os dados serão tratados e analisados estatisticamente de maneira descritiva, dispondo os resultados obtidos na forma de gráficos e tabelas de frequências absoluta e percentual. Os possíveis testes estatísticos empregados serão o Mann-Whitney e o Wilcoxon, com o objetivo de detectar diferenças significantes intra e intergrupos em relação aos parâmetros periodontais clínicos e os níveis de citocinas presentes no fluido gengival. Um intervalo de confiança de 95% será empregado.

Referências

AINAMO, J.; BAY, I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. **International Dental Journal**, v. 25, n. 4, p. 229-235, 1975.

AKCA, E. A.; YILDIRIM, E.; DALKIZ, M.; YAVUZYILMAZ, H.; BEYDEMIR, B. Effects of different retraction medicaments on gingival tissue. **Quintessence International**, v. 37, n. 1, p. 53-59, 2006.

AL HAMAD, K. Q.; AZAR, W. Z.; ALWAEELI, H. A.; SAID, K. N. A clinical study on the effects of cordless and conventional retraction techniques on the gingival and periodontal health. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 35, n. 12, p. 1053-1058, 2008.

AYO-YUSUF, O.A.; DRIESSEN, C.H.; BOTHA, A.J. SEM-EDX study of prepared human dentine surfaces exposed to gingival retraction fluids. **Journal of Dentistry**, v. 33, n. 9, p. 731-739, 2005.

BENNANI, V.; SCHWASS, D.; CHANDLER, N. Gingival retraction techniques for implants versus teeth: current status. **Journal of American Dental Association**, v. 139, n. 10, p. 1354-1363, 2008.

BENSON, B. W.; BOMBERG, T. J.; HATCH, R. A.; HOFFMAN, W. Tissue displacement methods in fixed prosthodontics. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 55, n. 2, p. 175-181, 1986.

CASSIDY, M.; GUTTERIDGE, D. L. An update on conventional fixed bridgework. Part 4: Clinical techniques. **Dental Update**, v. 21, n. 8, p. 316-321, 1994.

COUNTRYMAN, P. I.; HEDDLE, J. A. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 41, n. 2-3, p. 321-332, 1976.

CSILLAG, M.; NYIRI, G.; VAG, J.; FAZEKAS, A. Dose-related effects of epinephrine on human gingival blood flow and crevicular fluid production used as a soaking solution for chemo-mechanical tissue retraction. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 97, n. 1, p. 6-11, 2007.

DONOVAN, T. E.; CHEE, W. W. Current concepts in gingival displacement. **Dental Clinics of North America**, v. 48, n. 2, p. 433-444, 2004.

FENG, J.; ABOYOUSSEF, H.; WEINER, S.; SINGH, S.; JANDINSKI, J. The effect of gingival retraction procedures on periodontal indices and crevicular fluid cytokine levels: a pilot study. **Journal of Prosthodontics**, v. 15, n. 2, p. 108-112, 2006.

GARLET, G. P. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 12, p. 1349-1363, 2010.

GOLDBERG, P. V.; HIGGINBOTTOM, F. L.; WILSON, T. G. Periodontal considerations in restorative and implant therapy. **Periodontology 2000**, v. 25, p. 100-109, 2001.

GONG, Y.; LU, J.; DING, X. Clinical, microbiologic, and immunologic factors of orthodontic treatment-induced gingival enlargement. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v.140, n.1, p. 58-64, 2011.

GRAVES, D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 8, p. 1585-1591, 2008.

GUSTAFSSON, A.; ITO, H.; ASMAN, B.; BERGSTRÖM, K. Hyper-reactive mononuclear cells and neutrophils in chronic periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 33, n. 2, p. 126-129, 2006.

HANSEN, P. A.; TIRA, D. E.; BARLOW, J. Current methods of finish-line exposure by practicing prosthodontists. **Journal of Prosthodontics**, v. 8, n. 3, p. 163-170, 1999.

HAVEMOSE-POULSEN, A.; HOLMSTRUP, P. Factors affecting IL-1-mediated collagen metabolism by fibroblasts and the pathogenesis of periodontal disease: a review of the literature. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 8, n. 2, p. 217-236, 1997.

HO, W.; EUBANK, T.; LEBLEBICIOGLU, B.; MARSH, C.; WALTERS, J. Azithromycin decreases crevicular fluid volume and mediator content. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 8, p. 831-835, 2010.

IWASAKI, L. R.; HAACK, J. E.; NICKEL, J. C.; REINHARDT, R. A.; PETRO, T. M. Human interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist secretion and velocity of tooth movement. **Archives of Oral Biology**, v. 46, n. 2, p. 185-189, 2001.

KHOSRAVI, R.; TRAN, S. D.; LAMBERT, M.; O'LOUGHLIN, J.; KÂ, K.; FEINE, J. S.; CARON, C.; TREMBLAY, A.; NICOLAU, B. Adiposity and gingival crevicular fluid tumour necrosis factor-alpha levels in children. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 36, n. 4, p. 301-7, 2009.

KOPAC, I.; BATISTA, U.; CVETKO, E.; MARION, L. Viability of fibroblasts in cell culture after treatment with different chemical retraction agents. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 29, n. 1, p. 98-104, 2002.

KOPAC, I.; CVETKO, E.; MARION, L. Gingival inflammatory response induced by chemical retraction agents in beagle dogs. **International Journal of Prosthodontics**, v. 15, n. 1, p. 14-19, 2002.

KOPAC, I.; STERLE, M.; MARION, L. Electron microscopic analysis of the effects of chemical retraction agents on cultured rat keratinocytes. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 87, n. 1, p. 51-56, 2002.

KUMBULOGLU, O.; USER, A.; TOKSAVUL, S.; BOYACIOGLU, H. Clinical evaluation of different gingival retraction cords. **Quintessence International**, v. 38, n. 2, p. 92-98, 2007.

MIRANDA, L.A.; BRAGA, F.; FISCHER, R.G.; SZTAJNBOK, F.R.; FIGUEREDO, C.M.S.; GUSTAFSSON, A. Changes in periodontal and rheumatological conditions after 2 years in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Journal of Periodontology*, v. 77, n. 10, p. 1695-1700, 2006.

NEMETZ, H.; DONOVAN, T.; LANDESMAN, H. Exposing the gingival margin: a systematic approach for the control of hemorrhage. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 51, n. 5, p. 647-651, 1984.

NOWAKOWSKA, D.; SACZKO, J.; KULBACKA, J.; CHOROMANSKA, A. Dynamic Oxidoreductive Potential of Astringent Retraction Agents. **Folia Biologica**, v. 56, n. 6, p. 263-268, 2010.

PASSARIELLO, C.; PUTTINI, M.; VIRGA, A.; GIGOLA, P. Microbiological and host factors are involved in promoting the periodontal failure of metaloceramic crowns. **Clinical Oral Investigations**, 2011 Jul 1. DOI 10.1007/s00784-011-0585-0 [Epub ahead of print]

PERAKIS, N.; BELSER, U. C.; MAGNE, P. Final impressions: a review of material properties and description of a current technique. **International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 24, n. 2, p. 109-117, 2004.

POLAT, N. T.; OZDEMIR, A. K.; TURGUT, M. Effects of gingival retraction materials on gingival blood flow. **International Journal of Prosthodontics**, v. 20, n. 1, p. 57-62, 2007.

SHADDOX, L. M.; WIEDEY, J.; CALDERON, N. L.; MAGNUSSON, I.; BIMSTEIN, E.; BIDWELL, J. A.; ZAPERT, E. F.; AUKHIL, I.; WALLET, S. M. Local inflammatory markers and systemic endotoxin in aggressive periodontitis. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 9, p. 1140-1144, 2011.

The glossary of prosthodontic terms. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 94, n. 1, p. 10-92, 2005.

UEMATSU, S.; MOGI, M.; DEGUCHI, T. Interleukin (IL)-1 beta, IL-6, tumor necrosis factor-alpha, epidermal growth factor, and beta 2-microglobulin levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. **Journal of Dental Research**, v. 75, n. 1, p. 562-567, 1996.

WEIR, D. J.; WILLIAMS, B. H. Clinical effectiveness of mechanical-chemical tissue displacement methods. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 51, n. 3, p. 326-329, 1984.

WOODY, R. D.; MILLER, A.; STAFFANOU, R. S. Review of the pH of hemostatic agents used in tissue displacement. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 70, n. 2, p. 191-192, 1993.

YANG, J.C.; TSAI, C. M.; CHEN, M. S.; WEI, J. Y.; LEE, S. Y.; LIN, C. T. Clinical study of a newly developed injection-type gingival retraction material. **Chinese Dental Journal**, v. 24, n. 3, p. 147-151, 2005.

Orçamento

Material	Quantidade	Valor unitário (R\$)	Valor total (R\$)
Sistema ExpasyI [®]	1	1.400,00	1.400,00 ¹
Viscostat [®] Clear	5	8,00	40,00 ⁴
Fio de retração gengival Ultrapak [®]	2	50,00	100,00 ⁴
Kit silicone de adição Futura AD [®]	2	400,00	800,00 ¹
Gesso pedra especial	5	20,00	100,00 ⁴
Resina acrílica para provisórios TRIM II [®]	2	100,00	200,00 ¹
Kit ELISA ultrasensível para quantificação de IL-1, 96 testes	2	1.640,00	3.280,00 ³
Kit ELISA ultrasensível para quantificação de TNF- α , 192 testes	1	2.300,00	2.300,00 ³
Pontas de papel absorvente Periopaper [®]	1	440,00	440,00 ³

Ponta diamantada 4138	10	5,00	50,00 ⁴
Garrafa cultura celular 25cm ² c/ 10	2	18,00	36,00 ²
Garrafa cultura celular 75cm ² c/ 10	1	17,00	17,00 ²
Placa com tampa, fundo chato 96 poços	10	4,40	44,00 ²
Ponteira amarela 0-200µL c/ 1000	1	8,00	8,00 ²
PBS pH 7,2 10x concentrado 500ml, Gibco [®]	1	227,00	227,00 ²
Soro fetal bovino 500ml, Invitrogen [®]	1	310,00	310,00 ²
Solução de penicilina/estreptomicina 100ml, Gibco [®]	1	160,00	160,00 ²
Solução tripsina c/ EDTA 0,25% 500ml, Gibco [®]	1	307,00	307,00 ²
		TOTAL	11.679,00

¹Estes produtos serão doados pelos respectivos fabricantes.

²Material disponibilizado pela Prof^a Dr^a Sandra Beatriz Chaves Tarquínio.

³Material custeado pela Fundação de Apoio Universitário (FAU), por meio de projeto coordenado pelo Prof. Dr. Fabrício Ogliari.

⁴Material custeado pelos pesquisadores.

Cronograma de execução

[illegible]

[illegible]

2 Relatório de trabalho de campo

Neste capítulo estão relatadas as complementações e as alterações realizadas a partir do Projeto de Pesquisa, antes ou durante a execução do mesmo. Estas modificações foram sugeridas pela banca examinadora durante a ocasião da qualificação do projeto, ou mesmo foram acrescentadas pelos autores a partir do aprofundamento em relação ao conhecimento da literatura científica pertinente.

2.1 Título

A banca de qualificação do projeto sugeriu mudança no título, com o objetivo de enfatizar que o trabalho foi voltado para a área de Prótese Dentária.

2.2 Metodologia

Devido às várias dificuldades inerentes à realização de qualquer ensaio clínico randomizado, algumas modificações precisaram ser efetuadas com o objetivo de viabilizar a execução do mesmo. Inicialmente tivemos dificuldades na inclusão dos voluntários do estudo. Grande parte dos pacientes que nos procuravam eram fumantes, o que impossibilitava sua inclusão. Esse fato atrasou o início da etapa clínica do presente estudo. Além disso, alguns materiais utilizados nesta etapa não estão disponíveis para compra no Brasil, precisando ser importados, o que demanda tempo em demasia vistos os grandes entraves burocráticos no processo de importação.

Durante o tempo em que, devido a diversos motivos já citados, ficamos impossibilitados de iniciar a etapa clínica deste estudo, procuramos nos aprofundar na literatura disponível e observamos que seria interessante alterar o desenho do estudo. Como o desenho do tipo “boca-dividida” costuma ser contestado e, em nosso estudo, poderiam haver questionamentos quanto à sobreposição dos efeitos dos tratamentos

empregados, achamos por bem empregar o desenho cruzado, com wash-out de 10 dias. A literatura indica que este tempo é suficiente para reversão histológica do dano tecidual causado pelo afastamento gengival com fio.

Durante a qualificação, também foi sugerida pela banca a avaliação de parâmetros subjetivos relacionados à percepção do paciente frente aos tratamentos empregados. Assim, achamos por bem acrescentar na ficha de exame clínico um questionário em que os voluntários informaram através de questões objetivas, dados referentes à dor, sabor desagradável e estresse sentido durante os tratamentos. Além disso, outras questões relacionadas ao impacto dos tratamentos sobre a qualidade de vida dos indivíduos foram inseridas; no entanto, devido ao pequeno tamanho da amostra, os dados coletados não foram inseridos no artigo que contemplou os resultados da etapa clínica deste estudo.

Algumas modificações também precisaram ser realizadas na metodologia da etapa *in vitro* deste estudo. Como o cultivo celular primário de fibroblastos gengivais humanos foi inviável devido a dificuldades técnicas, para os testes de avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade foram empregadas células do ligamento periodontal de ratos. Além disso, a forma de obtenção dos eludatos e as concentrações destes foram modificadas com o intuito de aproximar o desenho do estudo e, conseqüentemente, os resultados do mesmo à prática clínica.

3 Artigo científico 1*

Biocompatibility of AlCl₃-based agents for gingival displacement by conventional and cordless technique

Hugo Ramalho **SARMENTO**¹ (Gonçalves Chaves St., 457, Center, 96015560, Pelotas, RS, Brazil; hugodonto@gmail.com)

Fábio Renato Manzolli **LEITE**² (Gonçalves Chaves St., 457, Center, 96015560, Pelotas, RS, Brazil; leite.fabio@gmail.com)

Eliana do Nascimento **TORRE**³ (Gonçalves Chaves St., 457, Center, 96015560, Pelotas, RS, Brazil; eliana_torre@hotmail.com)

Sandra Beatriz Chaves **TARQUINIO**² (Gonçalves Chaves St., 457, Center, 96015560, Pelotas, RS, Brazil; sbtarquinio@gmail.com)

Fernanda **FAOT**² (Gonçalves Chaves St., 457, Center, 96015560, Pelotas, RS, Brazil; fernanda.faot@gmail.com)

¹ DDS, Graduate Program in Dentistry, Federal University of Pelotas, RS, Brazil.

² DDS, MSc, PhD, Adjunct Professor, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, RS, Brazil.

³ DDS, MSc, Graduate Program in Dentistry, Federal University of Pelotas, RS, Brazil.

Name, degree, title, professional affiliation, full address of all authors

Corresponding author:

Fernanda Faot

School of Dentistry, Federal University of Pelotas,

Gonçalves Chaves St., 457, Center, Pelotas, RS, Brazil, 96015560

Phone/Fax: +55 53 32256741

E-mail: fernanda.faot@gmail.com

*Artigo formatado segundo as normas do periódico The International Journal of Prosthodontics

Abstract

Aims: To evaluate cytotoxicity/genotoxicity and pH of AlCl_3 -based agents for gingival displacement by conventional (Viscostat[®] Clear) or cordless technique (Expasyl[®]).

Methods: To obtain eluates astringents were diluted into culture medium for 1h, 4h, and 24h. pH was measured by digital pHmeter, cytotoxicity by MTT test, and genotoxicity by Micronuclei test. Data were analyzed by two-way ANOVA and Tukey's test ($P < 0.05$).

Results: pH values were higher for Viscostat ($P < 0.001$). Both astringents were non-cytotoxic at 1h ($P = 0.860$). Expasyl was more cytotoxic than Viscostat at 4h ($P = 0.011$) and 24h ($P < 0.001$). Expasyl genotoxicity was similar to control ($P = 0.304$).

Conclusion: AlCl_3 -based astringents presented acceptable cytotoxicity with no genotoxic difference between Expasyl and Viscostat.

Key words: Astringents, Materials Testing, In Vitro, Drug Toxicity, Micronucleus Tests.

Introduction

Gingival displacement is an essential procedure for making acute impressions of subgingival finishing lines, since a moisture-free sulcus is required for an effective impression. Conventional and cordless techniques are available for gingival displacement, however their biological effects regarding cellular responses remains scarcely documented¹.

Interesting clinical results have been documented for gingival displacement with astringents², however undesirable effects on the periodontal tissues may still occur³, mainly due to their low pH⁴. This study evaluated the biocompatibility (by cytotoxicity and genotoxicity tests) and pH of AlCl₃-based agents for gingival displacement by conventional (Viscostat[®] Clear) or cordless technique (Expasyl[®]). The null hypothesis was that both AlCl₃-based agents have the same behavior in terms of pH and biocompatibility.

Materials and Methods

The materials evaluated in this study, their composition, and manufacturers are described on Table 1.

Eluate preparation

Eluates were obtained by dilution of 100µl of each astringent into 1mL of DMEM culture medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, SIGMA Chemical Co., St Louis, MO, USA) for each eppendorf tube. The tubes were sonicated and stored at 37°C for 1h, 4h, or 24h. After centrifugation, the supernatant was transferred to another tube, which was frozen at -80°C until performing the tests.

pH evaluation

PH values were measured by digital pH meter after 1h, 4h and 24h (Quimis Q400A, Diadema, SP, Brazil).

Cell culture

Mouse periodontal ligament (mPDL) cells were cultivated according to Kopac et al³.

Cytotoxicity test (MTT assay)

mPDL cells (5×10^4 per well) were maintained in DMEM on 96-well plates (n=6) for 24h. After 24h-cell exposure to 200µl of each eluate or DMEM (control group) cytotoxicity was evaluated according to Nowakowska et al.⁴. The results were expressed as the percentage of untreated control cells.

Micronuclei test

mPDL cells (4×10^4) were grown on glass slides at 24-well plates. Cells were exposed to eluates (200µl) or DMEM (control) for 24h. After, cells were fixed in 3:1 methanol/acetic acid (30 min), air-dried, lysed in 1N HCl (40min), and stained by Schiff's reagent (2h). After water-rinsed, slides were stained by Fast Green dye, dried and mounted with Entellan. The number of micronuclei was determined microscopically (400X magnification) in 2000 cells/slide and two slides were included per group (n=4000).

Statistical Analysis

SigmaStat[®] software package (Systat Software Corporation, San Jose-CA, USA) was used for data analyzes. The null hypothesis was tested by ANOVA and Tukey's test ($p < 0,05$).

Results

pH evaluation

Both variables "product" and "time", and their interactions influenced significantly pH values ($P < 0.001$). Mean pH values regardless of the time were statistically higher for Viscostat than Expasyl ($p < 0.001$). For Viscostat, pH remained constant throughout tested times ($p = 0.9$). On the other hand, for Expasyl pH decreased after 1h ($p < 0.001$) and remained constant after this time ($p = 0.9$) (Table 2).

Cytotoxicity test [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay]

For cytotoxicity, both variables “product” and “time” were statistically significant, also were their interactions ($P<0.001$). At 1h both astringents were not cytotoxic. However, at 4h ($P=0.007$) and 24h ($P=0.001$) Expasyl was more cytotoxic than Viscostat. For Viscostat, cell viability decreased after 4h ($P=0.001$) and remained constant until 24h ($P=0.9$). For Expasyl, cell viability decreased after 4h ($P<0.001$) and 24h ($P<0.001$) (Table 3).

Micronuclei test

For micronuclei test only the variable “product” was statistically significant ($P=0.029$). Expasyl groups had statistically similar number of micronuclei ($P=0.3$). However, micronuclei amount for Expasyl and Viscostat groups did not differ statistically ($P=0.1$) (Table 4).

Discussion

This study was the first to evaluate Expasyl biocompatibility, an agent recently used on cordless gingival displacement, comparing with a conventional technique which employs an astringent associated with a gingival cord. According to our results the null hypotheses was rejected, since the AlCl_3 -based agents differently influenced biocompatibility and pH results.

In this study both 15% AlCl_3 and 25% AlCl_3 agents were non-cytotoxic after 1h. Another study³ showed a high cytotoxicity after 1min exposure to 25% AlCl_3 in liquid form (Racestyptine®, Septodont) probably due to its low pH (0.8). Our results showed a higher pH, around 8.5 for Viscostat and 5.0 for Expasyl. Probably, products presentation as gel and paste resulted on a more physiologic pH and a reduced amount of gingiva exposed to retraction agent effects⁴.

Despite cells exposed to Viscostat presented more micronuclei than Expasyl, this material showed statistically similar genotoxicity to control group. This result is in consonance with another study⁵ that showed a promising use of Expasyl as haemostatic agent during periradicular surgeries. Additionally, Expasyl is hydrophilic and easily removed by an air-water spray.

Conclusion

AlCl₃-based astringents showed acceptable cytotoxicity specially when employed up to 1h. However, Expasyl was the less genotoxic astringent in vitro.

Acknowledgements

The authors thank Labordental Distributor of Dental Products, for providing some of the materials used in this study; and CAPES/Brazil (project #384204220-53, process #23038.028455/2009-12) for financial support. H.R.S. is grateful to CAPES/Brazil for a MSc scholarship.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest

Tables

Table 1. Materials used in this study and its manufacturers, and compositions.

Material	Manufacturer	Composition	Clinical form
Expasyl [®]	Pierre Rolland (Mérignac, France)	15% Alluminum chloride-based	Paste
Viscostat [®] Clear	Ultradent Products (South Jordan, UT, USA)	25% Alluminum chloride-based	Gel

Table 2. Mean pH $\pm$ standard deviation (SD) for experimental groups.

Time	Mean pH ($\pm$ SD)	
	Viscostat	Expasyl
1h	8.50 $\pm$ 0.04 Aa	5.75 $\pm$ 0.08 Ba
4h	8.50 $\pm$ 0.06 Aa	4.98 $\pm$ 0.05 Bb
24h	8.52 $\pm$ 0.08 Aa	4.95 $\pm$ 0.05 Bb

Capital letters denote statistically significant differences into the same row. Lower letters denote statistically significant differences into the same column. (Tukey's test, $p < 0.05$)

Table 3. Cellular viability (%) for experimental groups.

Time	Cellular viability (%)	
	Viscostat	Expasyl
1h	103.6 Aa	102.8 Aa
4h	86.2 Ab	73.7 Bb
24h	86.8 Ab	48.4 Bc

Capital letters denote statistically significant differences into the same row. Lower letters denote statistically significant differences into the same column. (Tukey's test, $p < 0.05$)

Table 4. Number of micronuclei (MN) for experimental and control groups.

Time	MN		
	Viscostat	Expasyl	Control
1h	42 Aa	18 ABa	4 Ba
4h	34 Aa	17 ABa	4 Ba
24h	20 Aa	14 ABa	4 Ba

Capital letters denote statistically significant differences into the same row. Lower letters denote statistically significant differences into the same column. (Tukey's test, $p < 0.05$)

References

1. Jokstad A. Clinical trial of gingival retraction cords. *J Prosthet Dent* 1999;81:258-61.
2. Al Hamad KQ, Azar WZ, Alwaeli HA, Said KN. A clinical study on the effects of cordless and conventional retraction techniques on the gingival and periodontal health. *J Clin Periodontol* 2008;35:1053-8.
3. Kopac I, Batista U, Cvetko E, Marion L. Viability of fibroblasts in cell culture after treatment with different chemical retraction agents. *J Oral Rehabil* 2002;29:98-104.
4. Nowakowska D, Saczko J, Kulbacka J, Choromanska A. Dynamic oxidoreductive potential of astringent retraction agents. *Folia Biol (Praha)* 2010;56:263-8.
5. von Arx T, Jensen SS, Hänni S, Schenk RK. Haemostatic agents used in periradicular surgery: an experimental study of their efficacy and tissue reactions. *Int Endod J* 2006;39:800-8.

4 Artigo científico 2*

A double-blind randomized clinical trial of two techniques for gingival displacement

Hugo R. Sarmiento, DDS,^a Fábio R. M. Leite, PhD,^b Raquel V. F. Dantas, MSc,^c Fabrício A. Ogliari, PhD,^d Flávio F. Demarco, PhD,^b and Fernanda Faot, PhD,^b

School of Dentistry, Federal University of Pelotas; Graduate Program in Dentistry, Pelotas, RS, Brazil.

Supported by grant No. 1407/10, agreement No. 01.11.00.88.00 from FINEP/Brazil and No. 23038.028455/2009-12 from CAPES/Brazil.

^aMSc student, Graduate Program in Dentistry, Federal University of Pelotas, RS, Brazil.

^bProfessor, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, RS, Brazil.

^cPhD student, Graduate Program in Dentistry, Federal University of Pelotas, RS, Brazil.

^dProfessor, Materials Engineering School, Federal University of Pelotas, RS, Brazil.

Corresponding author:

Fernanda Faot

School of Dentistry, Federal University of Pelotas,

Gonçalves Chaves St., 457, Center, Pelotas, RS, Brazil, 96015560

Phone/Fax: +55 53 32256741

E-mail: fernanda.faot@gmail.com

Acknowledgements

The authors thank Labordental Distributor of Dental Products, for providing some of the materials used in this study. H.R.S. is grateful to CAPES/Brazil for a MSc scholarship.

*Artigo formatado segundo as normas do periódico Journal of Prosthetic Dentistry

ABSTRACT

Purpose: This randomized clinical study evaluated clinical and immunologic factors and patients' perceptions regarding to conventional and cordless gingival displacement (GD) techniques.

Material and Methods: A crossover, double-blind, randomized clinical trial (n=12) was designed to evaluate clinical, immunologic and individual perceptions before and after GD by two techniques, conventional (gingival cord + 25% AlCl₃ astringent gel) and cordless (15% AlCl₃ astringent-based paste). It was employed a wash-out period of 10 days between the techniques. Periodontal indices were evaluated on incisors prepared for metal-ceramic dental crown before (baseline), 1 day post-displacement and 10 day post-GD. Interleukin 1 β , Interleukin 6 and Tumor Necrosis Factor α concentrations were evaluated on gingival crevicular fluid before and 1 day after GD. Subjective parameters as pain, taste and stress were also evaluated after the GD techniques. Data were analyzed by One-way Repeated Measures ANOVA and Tukey test (immunologic factor), and Friedman test (periodontal parameters), and Fisher Exact or Qui-square test (pain, stress, and unpleasant flavor during GD), considering P<0.05.

Results: Gingival bleeding index, probing depth, and plaque index values were not significantly different among the groups at all the time intervals. Neither of the two evaluated techniques resulted in worse periodontal indices. Both techniques presented similar results for pain and unpleasant taste, however the conventional technique was statistically more stressing for the patients than cordless. Both treatments led to statistically higher mean concentrations of the three cytokines. The conventional technique resulted in the highest cytokines concentrations.

Conclusions: Cordless technique was less stressful for the subjects and resulted in lower levels of inflammatory cytokines after GD.

Key words: Gingival Retraction Techniques. Astringents. Periodontal Index. Gingival Crevicular Fluid. Cytokines.

Clinical implications: The results of this randomized clinical trial provide the clinician with data regarding the efficacy of gingival displacement techniques, conventional and cordless, during prosthetic procedures. Cordless technique resulted in lower inflammatory response and stress compared to conventional technique.

INTRODUCTION

Regardless of the selected technique for dental impression, gingival displacement is an essential procedure specially when making impressions of subgingival finishing lines, because a moisture-free sulcus is a requirement for an effective impression. A range of gingival retraction techniques (conventional and cordless) and products (fluids or gels; mainly astringents and vasoconstrictors) are available, however the efficacy of them remains scarcely documented¹.

Among astringents, stand out the based on aluminum chloride, aluminum sulfate and ferric sulfate, with aluminum chloride being the most widely used, mainly because of its low toxicity². Astringents have only local action which is an advantage, because the systemic action of adrenergic vasoconstrictors limits its clinical indication³. Astringents has shown good clinical results⁴, even though some in vivo⁵ and in vitro studies^{6,7} have demonstrated that these products can induce undesirable effects in tissues of the gingival margin, mainly due to its low pH ranging between 1 and 3².

Recently, cordless technique for gingival retraction was introduced with the promise of many advantages such as reduction of chair time and greater patient comfort, being minimally invasive⁸. A clinical trial evaluated the effects of two gingival displacement cordless techniques, one containing aluminum chloride and another that employs an elastomeric material, compared to the conventional technique (with cord). The three techniques led to temporary gingival inflammation. Moreover, only the cordless technique did not induce bleeding during or after gingival displacement⁴.

During gingival retraction for prosthetic purposes, in addition to mechanical trauma, the action of chemical agents can induce an inflammatory response on gingival tissue⁵. This response is mediated by inflammatory cytokines released by immune cells (macrophages and neutrophils) and fibroblasts⁹. These cytokine are present on gingival fluid, which presents an

increased volume due to the presence of inflammatory exudate¹⁰. Interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) are quickly produced by the innate immunity when a tissue injury occurs¹¹. Until the present day, no study were found in the major literature databases assessing inflammatory cytokines levels on gingival crevicular fluid after gingival displacement.

The aim of this study was to assess, by a randomized clinical trial, clinical and immunologic factors and patients' perceptions regarding two techniques for gingival displacement, conventional and cordless. The null hypotheses evaluated were that gingival displacement technique does not influence 1) inflammatory cytokine levels on gingival crevicular fluid; 2) clinical gingival parameters; and 3) individual factors like pain, stress and unpleasant taste on mouth during gingival displacement.

MATERIAL AND METHODS

The design of this crossover, double-blind, randomized clinical trial followed the guidelines published by Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT)¹². The flowchart of this trial is presented on Figure 1. The study protocol was approved by the local Ethics Committee (#54/2011) and, prior to enrollment; each subject received an informed consent form containing all the information regarding the risks and benefits of treatment. All participants signed the consent form.

Sample size

Sample size calculation was carried out based on a previous study¹³. The following parameters were set for sample size calculation: smallest expected difference between means; standard deviation of the difference between means of 2.5; beta error of 10%; and one-tailed alpha error of 5%. A 20% increase in sample size, taking into consideration potential losses or

refusals. The individuals (n=12) were invited to participate in this clinical trial through posters displayed on the dental school.

Eligibility criteria, randomization and blinding

Prior to dental examination, each subject filled out a medical history sheet and receive a complete dental prophylaxis to remove any biofilm present. Twenty-two subjects were examined to obtain 12 individuals who met the inclusion/exclusion criteria described below. Subjects were 39–60 years old (10 female and 2 male) in good general and dental health. To be included subjects had to have at least two anterior teeth with an indication of prosthetic dental crown. The subjects could not have systemic diseases, not being pregnant (if female) had not consumed antibiotics or anti-inflammatory drugs in the last 60 days and be non-smokers. Also, the selected teeth must have good periodontal health characterized by regular gingival margin with at least 2 mm of attached gingiva, non-fibrotic gingival tissue, no marginal recession, probing depth ≤ 3 mm, no evidence of significant loss of bone insertion and present no visible plaque and gingival bleeding¹⁴.

Clinical periodontal examination

The probing depth (PD), clinical attachment level (CAL), gingival bleeding index (GBI), plaque index (PI) and tooth mobility were recorded by a single examiner in all maxillary anterior teeth of the volunteers before gingival displacement (14) on days 0, 7, 8, 17, 18 and 27 (Fig. 1). Subjects were also asked to report the presence or absence of pain, stress, and unpleasant flavor (subjective reporting) during gingival displacement. Cold air test for sensitivity was also performed on the selected teeth before and after gingival displacement through a one second application of cold air from a dental unit syringe (at $20 \pm 3^\circ\text{C}$ at 60–65

psi). Gingival bleeding during gingival displacement was also assessed and recorded by the operator after the application of each technique.

Dental preparation and temporary restorations manufacture

On day 0 (baseline) the teeth were prepared for receiving metal-ceramic crowns by diamond burs #4138, #3168 and #3203 (KG Sorensen, Cotia, SP, Brazil), with 1mm subgingival termination. In the same clinical session acrylic temporary crowns were fabricated with a PEMA acrylic resin in order to promote a non-irritating factor (TRIM[®] II, Bossworth Company, Skokie, IL, USA).

Gingival displacement, impression and gingival crevicular fluid (GCF) collection

On day 4, for biofilm control a prophylaxis with pumice stone and rubber cup was held in all teeth of each volunteer. On day 7 the supragingival plaque was carefully removed by periodontal curette and tooth slightly dried by an air spray. The temporary crowns were removed and the GCF was collected from one of the teeth to be restored, randomly selected by lottery with the assistance of brown envelopes to constitute the control group. GCF collection for the control group was performed with sterile absorbent paper strips (Periopaper[®], Oraflow Incorporated, Amityville, NY, USA). The paper strip penetrated 1mm into the gingival sulcus on its mesiobuccal surface and remained there for 60s. After 90s a new paper strip was inserted into the sulcus on distobuccal surface and a second collection was made. The two strips of absorbent paper with the collected material were stored in a cryotube identified by a code known only by the researcher who made the collection. Each cryotube contained 100 mL of PBS (Phosphate Buffer Saline, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was centrifuged and only the supernatant was frozen at -80°C until laboratory analysis. Then the tooth received gingival displacement.

The gingival displacement technique (conventional or cordless) used in each tooth was randomly selected by lottery as described above. Conventional technique was applied according to the following protocol: application of a 25% AlCl_3 -based astringent gel (Viscostat Clear[®], Ultradent Products, South Jordan, UT, USA) around gingival margin followed by insertion of gingival cord (Ultrapak[®], Ultradent Products, South Jordan, UT, USA) with the aid of a packer (Fischer's Ultrapak Packer, 45° small size, Ultradent Products, South Jordan, UT, USA). Then, another application of Viscostat Clear[®] was carried out around gingival margin, according to manufacturer's instructions. The cord remained in the sulcus for 10min when it was gently removed and an air/water spray was applied to remove the astringent. Throughout the clinical section relative isolation with cotton roll and saliva sucker was used.

For cordless technique, the manufacturer's instructions were also followed: gingival margin was gently air-dried and Expasyl[®] was applied around the tooth's gingival margin for 2min. Then Expasyl[®] was removed by an air/water spray. Relative isolation and saliva sucker was also used.

Dental impressions were performed with polyvinyl siloxane impression material (Express[®] XT, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA). The single step double impression technique was used and the casts were poured one hour after to avoid bubbles due to hydrogen liberation during polyvinyl siloxane polymerization.

On day 8 another GCF collection was made as previously described in order to evaluate the immune inflammatory gingival response 24h after GD. At this same day a new clinical periodontal examination was performed as previously described by an examiner blinded for the gingival displacement technique employed.

On day 17, a GCF collection was performed in the selected tooth to receive the second gingival displacement technique, a new clinical periodontal examination was performed and

the tooth received the gingival displacement. Dental impression was performed as described above. At day 18 the anterior teeth received a new clinical periodontal examination and the GCF was collected on the second tooth, which received gingival displacement to evaluate 24h inflammatory response. Ten days after the second impression (day 27), a new clinical periodontal examination was performed.

Interleukin 1 (IL-1 β), Interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor α (TNF- α) in GCF

IL-1 β , IL-6 and TNF- α levels (pg/ μ l) in GCF were quantified by a blinded evaluator using ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), specific for each cytokine, according to manufacturer's recommendations (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA).

Data analyses

SigmaStat[®] software package (Systat Software Corporation, San Jose-CA, USA) was used for data analyses. Friedman test was used to analyze the differences of the periodontal parameters (PD, GBI, and PI) among the three visits for each technique (days 7, 8 and 17 for the first technique and days 17, 18 and 27 for the second technique) ($P < 0.05$). Subjective reporting (pain, stress, and unpleasant flavor) during gingival displacement were analyzed by Fisher's Exact or Chi-square test ($P < 0.05$), according to data distribution. With regard to CAL, tooth mobility, sensitivity to cold air and bleeding within and after the procedure, simple descriptive statistics were computed using the frequency and descriptive procedures.

For IL-1 β data, the assumptions of equality of variances and normal distribution of errors were violated and data were transformed by rank. Data analysis of the cytokines concentration were analyzed by one-way repeated measures Analysis of Variance followed by Tukey's test ($P < 0.05$).

RESULTS

Twenty-four incisors in 12 subjects (10 female and 2 male) free of clinical signs of gingivitis participated in this study. The participants were between 39 and 60 years of age with a mean of 47 (± 7.4) years.

Mobility and CAL measurements were not different among the two groups in the three times evaluated (Table 1). Means of PD for the two techniques are presented in Table 1. Mean ranks of PD, GBI, and PI are presented in Tables 2 and 3 for the cordless and conventional technique, respectively. Friedman test was used to compare the mean ranks between the three groups at the three evaluated periods ($P < 0.05$). GBI, PD, and PI values at the baseline measurements were homogenous among the two groups and significantly different at all time intervals. Neither of the two evaluated techniques resulted in a significant increase in PD, GBI and PI values (Tables 2 and 3).

It was not observed gingival bleeding on both groups during and after each gingival retraction technique. Regardless of the gingival retraction technique employed, it was not observed differences on CAL, tooth mobility, sensitivity to cold air and bleeding throughout the experiment.

Regarding to the subjective parameters reported by subjects, conventional technique was statistically more stressing. There were no differences between techniques related to pain and unpleasant taste (Table 4).

Gingival displacement by the both treatments (conventional or cordless) led to higher mean concentrations of the three evaluated cytokines. Conventional gingival displacement technique resulted in the highest concentrations for the three cytokines (Table 5).

DISCUSSION

The present study was a clinical trial which evaluated the efficacy of two gingival displacement techniques, conventional and cordless. Only one study clinically compared both techniques, however only periodontal indices and subjective parameters were compared⁴. Another study evaluated TNF- α level on GCF after gingival displacement by conventional technique, without comparing to other techniques¹⁵. This was the first study that used a randomized clinical trial design to evaluate clinical, immunologic and individual parameters, in order to compare conventional and cordless techniques for gingival displacement. The null hypotheses were partially denied, since gingival displacement techniques influenced inflammatory cytokine levels on GCF and stress during gingival displacement.

In this study the cordless technique employed Expasyl[®], which is a material for gingival displacement with paste-like consistency that associates the hemostatic properties of aluminum chloride and the hygroscopic expansion of kaolin offering a moderate displacement of the gingiva approximately 2min after its application and contact with GCF⁸. However, the predictability and efficacy of this technique has still to be established¹⁶.

Randomized clinical trials as this current study when appropriately designed and conducted can be considered the gold standard in assessing healthcare interventions¹². A wash-out period of ten days was used because a previous study showed that the tissue damage arising of gingival displacement by conventional technique is histologically recovered after 10 days¹⁷. Sample size calculation was performed taking into account the main outcome of this study, considering immunological parameters (IL-1 β , IL-6 and TNF- α level) reported by another study¹³. Other secondary outcomes were also evaluated, like periodontal indices, bleeding and subjective self-reported parameters such as pain, stress and unpleasant flavor. Both groups were statistically similar on baseline results. Also, there were no differences on periodontal indices between groups at the different time points (baseline, 1, and 10 days post-displacement). Other study⁴ that employed a larger sample (n=60) comparing a conventional

and a cordless technique also showed no differences between groups for periodontal indices, except for Gingival Index. This study reported that bleeding was only induced by conventional technique at approximately 30% of subjects during and after displacement. The occurrence of gingival bleeding was probably due to the fact that it was used a non-impregnated cord and no hemostatic solution was employed. These results are in disagreement with ours, which observed no bleeding during or after displacement. For conventional technique, a non-impregnated cord was used combined with an Al_2Cl_3 -based astringent solution. Also, in the present study there were no differences between groups considering pain and unpleasant flavor.

Even that the sample size does not have offered an adequate statistical power to measure the secondary outcomes above, statistically significant difference between groups was observed for stress reporting by the patient. Cordless technique was less stressing than conventional technique. This may be explained because the conventional technique tends to be difficult to perform and it is dependent to the operator ability, consuming a lot of clinical time, and leading to bleeding, and discomfort to the patient¹⁵.

During gingival displacement for prosthodontics purposes, mechanical trauma per se may induce a gingival inflammatory response⁵. The inflammatory response leads to an increased GCF volume, mainly due to the presence of inflammatory exudate¹⁰. In this inflammatory exudates mostly of the pro-inflammatory cytokines of the innate immunity are present, e.g. IL-1 β , IL-6 and TNF- α ¹¹. In this study, regardless of the technique employed for gingival displacement (conventional and cordless), both treatments resulted on higher IL-1 β , IL-6 and TNF- α concentration compared to baseline.

The quality of the impression may be significantly disturbed by the presence of GCF. To avoid this effect, a dried sulcus is only possible using chemical methods like astringents. Aluminum chloride is a widely used astringent that acts predominantly by precipitation of

proteins and inhibition of transcapillary movement of plasma proteins¹⁶. Both techniques employed in this study uses aluminum chloride-based products. Results showed that conventional technique led to the highest cytokines levels. This result is in accordance with other study that showed better results for the same cordless technique employed in this study regarding to effective drying of the sulcus when compared to epinephrine-impregnated cords¹⁸. Moreover, another study showed an histologically higher percentage of intact junctional epithelium for cordless technique (Expasyl) compared with the conventional technique¹⁹.

Results of this study indicated that cordless technique was more conservative to the periodontum and less stressful for patients. However, as observed by other investigation¹⁸, the authors of this present study clinically observed that in many cases with cordless technique the sulcus was not opened up as wide as when retraction cords were employed. Since it was not the objective of this study to evaluate the effectiveness in achieving gingival displacement among the techniques, further research should be focused to this issue. Moreover, each type of displacement seems to present interesting characteristics. So, it is important to associate these positive characteristics to a specific challenge offered by each specific condition of the patient.

CONCLUSIONS

Cordless gingival displacement technique lead to lower levels of pro-inflammatory cytokines on gingival crevicular fluid and less stress for patients compared to conventional technique.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Jokstad A. Clinical trial of gingival retraction cords. *J Prosthet Dent* 1999;81:258-61.
2. Nowakowska D, Saczko J, Kulbacka J, Choromanska A. Dynamic oxidoreductive potential of astringent retraction agents. *Folia Biol (Praha)* 2010;56:263-8.
3. Polat NT, Ozdemir AK, Turgut M. Effects of gingival retraction materials on gingival blood flow. *Int J Prosthodont* 2007;20:57-62.
4. Al Hamad KQ, Azar WZ, Alwaeli HA, Said KN. A clinical study on the effects of cordless and conventional retraction techniques on the gingival and periodontal health. *J Clin Periodontol* 2008;35:1053-8.
5. Kopac I, Cvetko E, Marion L. Gingival inflammatory response induced by chemical retraction agents in beagle dogs. *Int J Prosthodont* 2002;15:14-9.
6. Kopac I, Batista U, Cvetko E, Marion L. Viability of fibroblasts in cell culture after treatment with different chemical retraction agents. *J Oral Rehabil* 2002;29:98-104.
7. Kopac I, Sterle M, Marion L. Electron microscopic analysis of the effects of chemical retraction agents on cultured rat keratinocytes. *J Prosthet Dent* 2002;87:51-6.
8. Perakis N, Belser UC, Magne P. Final impressions: a review of material properties and description of a current technique. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2004;24:109-17.
9. Gustafsson A, Ito H, Asman B, Bergström K. Hyper-reactive mononuclear cells and neutrophils in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2006;33:126-9.
10. Ho W, Eubank T, Leblebicioglu B, Marsh C, Walters J. Azithromycin decreases crevicular fluid volume and mediator content. *J Dent Res* 2010;89:831-5.
11. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res* 2010;89:1349-63.

12. Schulz KF, Altman DG, Moher D, Group C. CONSORT 2010 statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ* 2010;340:c332.
13. Passariello C, Puttini M, Virga A, Gigola P. Microbiological and host factors are involved in promoting the periodontal failure of metaloceramic crowns. *Clin Oral Investig* 2012;16:987-95.
14. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J* 1975;25:229-35.
15. Feng J, Aboyoussef H, Weiner S, Singh S, Jandinski J. The effect of gingival retraction procedures on periodontal indices and crevicular fluid cytokine levels: a pilot study. *J Prosthodont* 2006;15:108-12.
16. Donovan TE, Chee WW. Current concepts in gingival displacement. *Dent Clin North Am* 2004;48:vi, 433-44.
17. Loe H, Silness J. Tissue reactions to string packs used in fixed restorations. *J Prosth Dent* 1963;13:318-23.
18. Wöstmann B, Rehmann P, Balkenhol M. Influence of different retraction techniques on crevicular fluid flow. *Int J Prosthodont* 2008;21:215-6.
19. Phatale S, Marawar PP, Byakod G, Lagdive SB, Kalburge JV. Effect of retraction materials on gingival health: A histopathological study. *J Indian Soc Periodontol* 2010;14:35-9.

TABLES

Table 1. Subject distribution for periodontal parameters at the three visits for each technique (Cordless, Expasyl; Conventional, Ultrapak Cord + Viscostat Clear)

Parameter	Subjects distribution					
	Before displacement		1day post-displacement		10 day post-displacement	
	Cordless	Conventional	Cordless	Conventional	Cordless	Conventional
PD (mm)						
1	12	12	12	10	11	12
2	0	0	0	2	1	0
Mean $\pm$ SD	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0	1.17 $\pm$ 0.39	1.08 $\pm$ 0.29	1 $\pm$ 0
GBI						
0	11	12	11	10	12	12
1	1	0	1	2	0	0
PI						
0	11	12	12	12	12	11
1	1	0	0	0	0	1
Mobility						
0	12	12	12	12	12	12
CAL						
0	12	12	12	12	12	12

PD, probing depth; GI, gingival index; PI, plaque index; CAL, clinical attachment level.

Table 2. Mean ranks of probing depth (PD), gingival index (GI), and plaque index (PI) for the Cordless technique group.

Index	Time	n	Mean rank	<i>p</i> *
PD	Before displacement	12	1.00	0.368
	1day post-displacement	12	1.00	
	10 day post-displacement	12	1.00	
GBI	Before displacement	12	0.00	0.368
	1day post-displacement	12	0.00	
	10 day post-displacement	12	0.00	
PI	Before displacement	12	0.00	0.368
	1day post-displacement	12	0.00	
	10 day post-displacement	12	0.00	

*Friedman test ($P < 0.05$)

Table 3. Mean ranks of probing depth (PD), gingival index (GI), and plaque index (PI) for the Conventional technique group

Index	Time	n	Mean rank	<i>p</i> *
PD	Before displacement	12	1.00	0.135
	1day post-displacement	12	1.00	
	10 day post-displacement	12	1.00	
GBI	Before displacement	12	0.0	0.135
	1day post-displacement	12	0.0	
	10 day post-displacement	12	0.0	
PI	Before displacement	12	0.0	0.368
	1day post-displacement	12	0.0	
	10 day post-displacement	12	0.0	

*Friedman test ($P < 0.05$)

Table 4. Subjective parameters reported by subjects after gingival displacement.

Parameter	Cordless	Conventional	<i>p</i>
<i>Pain</i>			0.193*
Yes	2	6	
No	10	6	
<i>Unpleasant taste</i>			0.221 [#]
Yes	4	8	
No	8	4	
<i>Stress</i>			
Yes	0	6	0.014*
No	12	6	

*Fisher Exact test (P <0.05); [#]Qui-square test (P <0.05).

Table 5. Mean cytokine concentration (pg/ μ l) $\pm$ standard deviation (SD) before (control) and after treatments.

Technique	Cytokine (pg/ μ l $\pm$ SD)		
	IL-1 β	IL-6	TNF- α
Baseline	6.0 $\pm$ 0.4 ^A	2.87 $\pm$ 0.3 ^A	4.61 $\pm$ 0.4 ^A
Cordless	15.73 $\pm$ 1.3 ^B	11.82 $\pm$ 1.3 ^B	6.78 $\pm$ 0.5 ^B
Conventional	17.93 $\pm$ 0.7 ^C	13.87 $\pm$ 0.8 ^C	8.12 $\pm$ 0.5 ^C

Capital letters denote statistically significant differences into the same column (Tukey's test, P < 0.05).

FIGURES

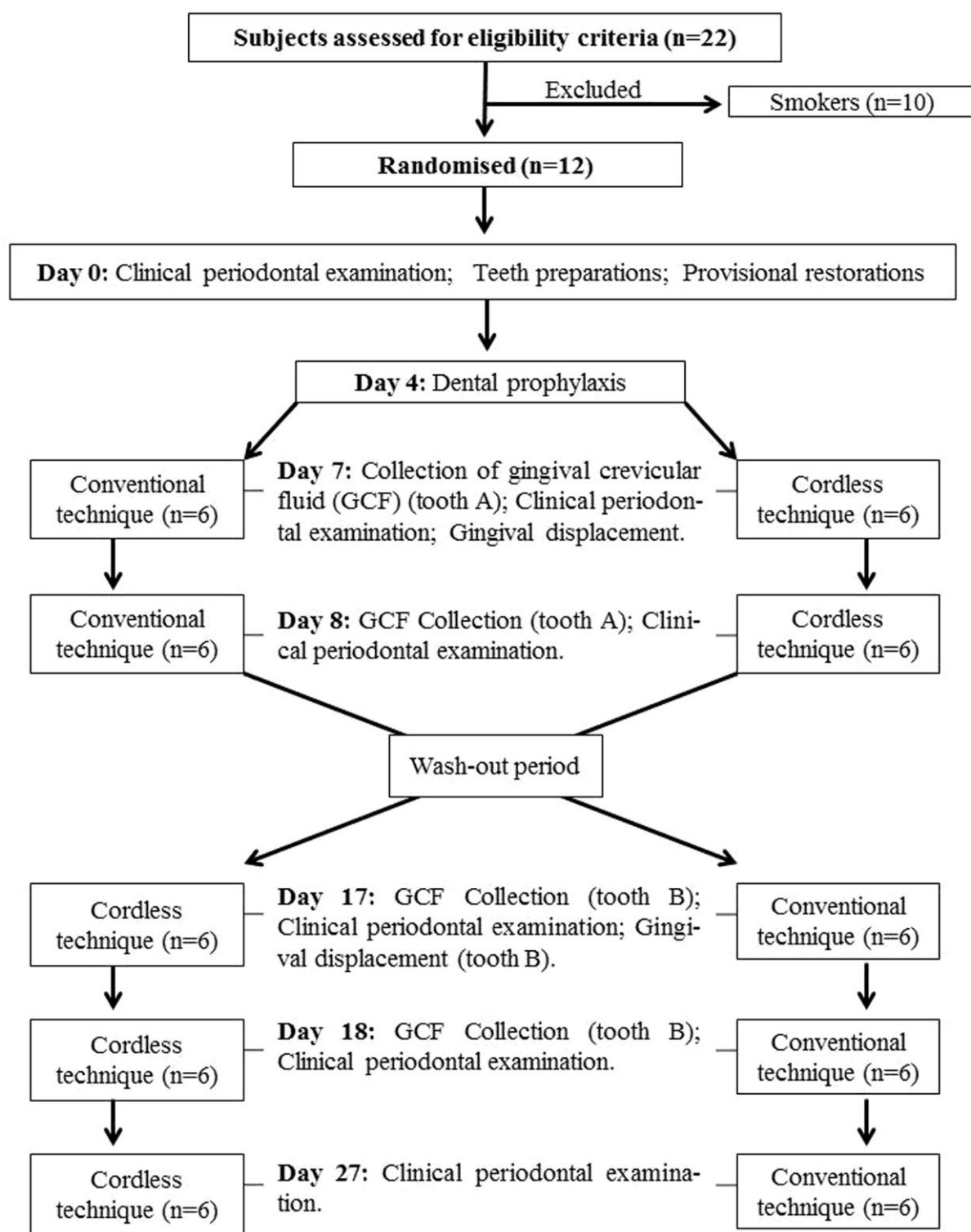


Fig. 1. Flow diagram of the trial.

5 Conclusões

Diante dos resultados deste trabalho, podemos concluir que:

- Os adstringentes à base de Cloreto de Alumínio avaliados neste estudo apresentaram citotoxicidade aceitável;
- Expasyl e Viscostat apresentaram genotoxicidade semelhante e superior ao grupo controle;
- A técnica de moldagem livre de fio (com Expasyl) foi menos estressante para os pacientes e resultou nos menores níveis de citocinas inflamatórias após afastamento gengival comparada à técnica convencional.

6 Referências

AINAMO, J.; BAY, I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. **International Dental Journal**, v. 25, n. 4, p. 229-235, 1975.

AKCA, E. A.; YILDIRIM, E.; DALKIZ, M.; YAVUZYILMAZ, H.; BEYDEMIR, B. Effects of different retraction medicaments on gingival tissue. **Quintessence International**, v. 37, n. 1, p. 53-59, 2006.

AL HAMAD, K. Q.; AZAR, W. Z.; ALWAEELI, H. A.; SAID, K. N. A clinical study on the effects of cordless and conventional retraction techniques on the gingival and periodontal health. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 35, n. 12, p. 1053-1058, 2008.

AYO-YUSUF, O.A.; DRIESSEN, C.H.; BOTHA, A.J. SEM-EDX study of prepared human dentine surfaces exposed to gingival retraction fluids. **Journal of Dentistry**, v. 33, n. 9, p. 731-739, 2005.

BENNANI, V.; SCHWASS, D.; CHANDLER, N. Gingival retraction techniques for implants versus teeth: current status. **Journal of American Dental Association**, v. 139, n. 10, p. 1354-1363, 2008.

BENSON, B. W.; BOMBERG, T. J.; HATCH, R. A.; HOFFMAN, W. Tissue displacement methods in fixed prosthodontics. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 55, n. 2, p. 175-181, 1986.

CASSIDY, M.; GUTTERIDGE, D. L. An update on conventional fixed bridgework. Part 4: Clinical techniques. **Dental Update**, v. 21, n. 8, p. 316-321, 1994.

COUNTRYMAN, P. I.; HEDDLE, J. A. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 41, n. 2-3, p. 321-332, 1976.

CSILLAG, M.; NYIRI, G.; VAG, J.; FAZEKAS, A. Dose-related effects of epinephrine on human gingival blood flow and crevicular fluid production used as a soaking solution for chemo-mechanical tissue retraction. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 97, n. 1, p. 6-11, 2007.

DONOVAN, T. E.; CHEE, W. W. Current concepts in gingival displacement. **Dental Clinics of North America**, v. 48, n. 2, p. 433-444, 2004.

FENG, J.; ABOYOUSSEF, H.; WEINER, S.; SINGH, S.; JANDINSKI, J. The effect of gingival retraction procedures on periodontal indices and crevicular fluid cytokine levels: a pilot study. **Journal of Prosthodontics**, v. 15, n. 2, p. 108-112, 2006.

GARLET, G. P. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 12, p. 1349-1363, 2010.

GOLDBERG, P. V.; HIGGINBOTTOM, F. L.; WILSON, T. G. Periodontal considerations in restorative and implant therapy. **Periodontology 2000**, v. 25, p. 100-109, 2001.

GONG, Y.; LU, J.; DING, X. Clinical, microbiologic, and immunologic factors of orthodontic treatment-induced gingival enlargement. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v.140, n.1, p. 58-64, 2011.

GRAVES, D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 8, p. 1585-1591, 2008.

GUSTAFSSON, A.; ITO, H.; ASMAN, B.; BERGSTRÖM, K. Hyper-reactive mononuclear cells and neutrophils in chronic periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 33, n. 2, p. 126-129, 2006.

HANSEN, P. A.; TIRA, D. E.; BARLOW, J. Current methods of finish-line exposure by practicing prosthodontists. **Journal of Prosthodontics**, v. 8, n. 3, p. 163-170, 1999.

HAVEMOSE-POULSEN, A.; HOLMSTRUP, P. Factors affecting IL-1-mediated collagen metabolism by fibroblasts and the pathogenesis of periodontal disease: a review of the literature. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 8, n. 2, p. 217-236, 1997.

HO, W.; EUBANK, T.; LEBLEBICIOGLU, B.; MARSH, C.; WALTERS, J. Azithromycin decreases crevicular fluid volume and mediator content. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 8, p. 831-835, 2010.

IWASAKI, L. R.; HAACK, J. E.; NICKEL, J. C.; REINHARDT, R. A.; PETRO, T. M. Human interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist secretion and velocity of tooth movement. **Archives of Oral Biology**, v. 46, n. 2, p. 185-189, 2001.

JOKSTAD, A. Clinical trial of gingival retraction cords. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 81, n. 3, p. 258-61, 1999.

KOPAC, I.; BATISTA, U.; CVETKO, E.; MARION, L. Viability of fibroblasts in cell culture after treatment with different chemical retraction agents. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 29, n. 1, p. 98-104, 2002.

KOPAC, I.; CVETKO, E.; MARION, L. Gingival inflammatory response induced by chemical retraction agents in beagle dogs. **International Journal of Prosthodontics**, v. 15, n. 1, p. 14-19, 2002.

KOPAC, I.; STERLE, M.; MARION, L. Electron microscopic analysis of the effects of chemical retraction agents on cultured rat keratinocytes. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 87, n. 1, p. 51-56, 2002.

KHOSRAVI, R.; TRAN, S. D.; LAMBERT, M.; O'LOUGHLIN, J.; KÂ, K.; FEINE, J. S.; CARON, C.; TREMBLAY, A.; NICOLAU, B. Adiposity and gingival crevicular fluid

tumour necrosis factor-alpha levels in children. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 36, n. 4, p. 301-7, 2009.

KUMBULOGLU, O.; USER, A.; TOKSAVUL, S.; BOYACIOGLU, H. Clinical evaluation of different gingival retraction cords. **Quintessence International**, v. 38, n. 2, p. 92-98, 2007.

LOE, H; SILNESS, J. Tissue reactions to string packs used in fixed restorations. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v.13, n. 2, p. 318-23, 1963.

MIRANDA, L.A.; BRAGA, F.; FISCHER, R.G.; SZTAJNBOK, F.R.; FIGUEREDO, C.M.S.; GUSTAFSSON, A. Changes in periodontal and rheumatological conditions after 2 years in patients with juvenile idiopathic arthritis. **Journal of Periodontology**, v. 77, n. 10, p. 1695-1700, 2006.

NEMETZ, H.; DONOVAN, T.; LANDESMAN, H. Exposing the gingival margin: a systematic approach for the control of hemorrhage. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 51, n. 5, p. 647-651, 1984.

NOWAKOWSKA, D.; SACZKO, J.; KULBACKA, J.; CHOROMANSKA, A. Dynamic Oxidoreductive Potential of Astringent Retraction Agents. **Folia Biologica**, v. 56, n. 6, p. 263-268, 2010.

PASSARIELLO, C.; PUTTINI, M.; VIRGA, A.; GIGOLA, P. Microbiological and host factors are involved in promoting the periodontal failure of metaloceramic crowns. **Clinical Oral Investigations**, v. 16, n. 3, p. 987-95, 2012.

PERAKIS, N.; BELSER, U. C.; MAGNE, P. Final impressions: a review of material properties and description of a current technique. **International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 24, n. 2, p. 109-117, 2004.

POLAT, N. T.; OZDEMIR, A. K.; TURGUT, M. Effects of gingival retraction materials on gingival blood flow. **International Journal of Prosthodontics**, v. 20, n. 1, p. 57-62, 2007.

PHATALE, S; MARAWAr, PP; BYAKOD, G; LAGDIVE, SB; KALBURGE, JV. Effect of retraction materials on gingival health: A histopathological study. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 14, n. 1, p. 35-9, 2010.

SHADDOX, L. M.; WIEDEY, J.; CALDERON, N. L.; MAGNUSSON, I.; BIMSTEIN, E.; BIDWELL, J. A.; ZAPERT, E. F.; AUKHIL, I.; WALLET, S. M. Local inflammatory markers and systemic endotoxin in aggressive periodontitis. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 9, p. 1140-1144, 2011.

SCHULZ, KF; ALTMAN, DG; MOHER, D; GROUP, C. CONSORT 2010 statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. **BMJ**, v. 340, c332, 2010.

The glossary of prosthodontic terms. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 94, n. 1, p. 10-92, 2005.

UEMATSU, S.; MOGI, M.; DEGUCHI, T. Interleukin (IL)-1 beta, IL-6, tumor necrosis factor-alpha, epidermal growth factor, and beta 2-microglobulin levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. **Journal of Dental Research**, v. 75, n. 1, p. 562-567, 1996.

VON ARX, T; JENSEN, SS; HÄNNI, S; SCHENK, RK. Haemostatic agents used in periradicular surgery: an experimental study of their efficacy and tissue reactions. **International Endodontic Journal**, v. 39, n. 10, p. 800-8, 2006;

WEIR, D. J.; WILLIAMS, B. H. Clinical effectiveness of mechanical-chemical tissue displacement methods. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 51, n. 3, p. 326-329, 1984.

WOODY, R. D.; MILLER, A.; STAFFANOU, R. S. Review of the pH of hemostatic agents used in tissue displacement. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 70, n. 2, p. 191-192, 1993.

WÖSTMANN, B; REHMANN, P; BALKENHOL, M. Influence of different retraction techniques on crevicular fluid flow. **International Journal of Prosthodontics**, v. 21, n. 3, p. 215-6, 2008.

YANG, J.C.; TSAI, C. M.; CHEN, M. S.; WEI, J. Y.; LEE, S. Y.; LIN, C. T. Clinical study of a newly developed injection-type gingival retraction material. **Chinese Dental Journal**, v. 24, n. 3, p. 147-151, 2005.

APÊNDICES

Apêndice 1- Ficha de exame clínico



Universidade Federal de Pelotas
Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Projeto de Dissertação
Mestrando – Hugo Ramalho Sarmiento
Orientadora – Prof^a Dr^a Fernanda Faot



Potencial inflamatório de duas técnicas para afastamento
gingival utilizadas durante procedimentos protéticos

FICHA N°

1- Identificação:

Nome: _____ Idade: _____ Sexo: _____ Cor: _____

Endereço: _____

Telefone: _____ Celular: _____ E-mail: _____

Telefone de parente próximo: _____ Parentesco: _____

Endereço deste parente: _____

Mais algum contato? _____

2- História médica:

- É portador(a) de alguma doença sistêmica? () Sim _____ () Não
- É fumante ou ex-fumante? () Sim () Não () Ex-fumante _____
- Se do sexo feminino, está grávida ou sob suspeita? () Sim () Não () NSA
- Consumiu anti-inflamatório ou antibiótico nos últimos 60 dias? () Sim () Não

3- Exame clínico inicial (Data: ____/____/____):

Profundidade de sondagem:

13				12				11				21				22				23			

Nível clínico de inserção:

13				12				11				21				22				23			

Índice de sangramento gengival:

13	12	11	21	22	23

Índice de placa visível:

13	12	11	21	22	23

Mobilidade dentária:

13	12	11	21	22	23

4- Dentes selecionados para o estudo (**anotar informações na sessão de moldagem; fazer sorteio com envelopes pardos**):

	Controle	1ª Técnica: A / B	2ª Técnica: A / B
Dente			
Sensibilidade antes? (jato de ar antes do afastamento)			
Sensibilidade depois? (jato de ar após afastamento)			
Sangramento? (durante/após afastamento)			

5- Avaliação de dor e satisfação do paciente durante o afastamento gengival (1ª técnica sorteada):

5.1- Na sessão do afastamento com _____ (1ª técnica sorteada):

I- Você sentiu dor durante o procedimento?

(nem um pouco)1-----2-----3-----4-----5(muitíssimo)

II- Você sentiu sabor desagradável na boca?

(nem um pouco)1-----2-----3-----4-----5(muitíssimo)

III- Você se sentiu estressado por causa do procedimento?

(nem um pouco)1-----2-----3-----4-----5(muitíssimo)

6- Exame clínico 2 dias após afastamento com _____ (1ª técnica sorteada) (Data: ____/____/____):

Profundidade de sondagem:

13	12	11	21	22	23

Nível clínico de inserção:

13	12	11	21	22	23

Índice de sangramento gengival:

13	12	11	21	22	23

Índice de placa visível:

13	12	11	21	22	23

Mobilidade dentária:

13	12	11	21	22	23

7- Avaliação de dor e satisfação do paciente após o afastamento gengival:

7.1- 7 dias após o afastamento com _____ (1ª técnica sorteada) (Data: ____/____/____):

I- A gengiva doeu nos últimos 7 dias?

(nem um pouco)1-----2-----3-----4-----5(muitíssimo)

II- Você sentiu desconforto ao mastigar?

(nem um pouco)1-----2-----3-----4-----5(muitíssimo)

III- Você sentiu desconforto ao falar?

(nem um pouco)1-----2-----3-----4-----5(muitíssimo)

IV- Você ficou envergonhado e evitou sorrir por achar que os dentes e gengiva estavam feios?

(nem um pouco)1-----2-----3-----4-----5(muitíssimo)

V- A gengiva demorou a cicatrizar?

(nem um pouco)1-----2-----3-----4-----5(muitíssimo)

VI- Você deixou de comer o que gostaria?

(nem um pouco)1-----2-----3-----4-----5(muitíssimo)

VII- Você deixou de praticar suas atividades diárias?

(nem um pouco)1-----2-----3-----4-----5(muitíssimo)

VIII- Você dormiu mal por causa do desconforto na gengiva e dente?

(nem um pouco)1-----2-----3-----4-----5(muitíssimo)

IX- Você considera que seu desempenho no trabalho esteve prejudicado após o procedimento?

(nem um pouco)1-----2-----3-----4-----5(muitíssimo)

X- Você considera que suas relações com amigos ou colegas esteve prejudicada após o procedimento?

(nem um pouco)1-----2-----3-----4-----5(muitíssimo)

XI- Você considera que sua relação com seu namorado/companheiro/esposo esteve prejudicada após o procedimento?

(nem um pouco)1-----2-----3-----4-----5(muitíssimo)

8- Exame clínico 7 dias após afastamento com _____ (1ª técnica sorteada) (Data: ____/____/____):

Profundidade de sondagem:

13				12				11				21				22				23			

Nível clínico de inserção:

13				12				11				21				22				23			

Índice de sangramento gengival:

13	12	11	21	22	23

Índice de placa visível:

13	12	11	21	22	23

Mobilidade dentária:

13	12	11	21	22	23

9- Avaliação de dor e satisfação do paciente durante o afastamento gengival (2ª técnica sorteada):

9.1- Na sessão do afastamento com _____ (2ª técnica sorteada) (Data: ____/____/____):

I- Você sentiu dor durante o procedimento?

(nem um pouco) 1-----2-----3-----4-----5(muitíssimo)

II- Você sentiu sabor desagradável na boca?

(nem um pouco) 1-----2-----3-----4-----5(muitíssimo)

III- Você se sentiu estressado por causa do procedimento?

(nem um pouco) 1-----2-----3-----4-----5(muitíssimo)

10- Exame clínico 2 dias após afastamento com _____ (2ª técnica sorteada) (Data: ____/____/____):

Profundidade de sondagem:

13				12				11				21				22				23			

Nível clínico de inserção:

13				12				11				21				22				23			

Índice de sangramento gengival:

13	12	11	21	22	23

Índice de placa visível:

13	12	11	21	22	23

Mobilidade dentária:

13	12	11	21	22	23

11- Avaliação de dor e satisfação do paciente após o afastamento gengival (2ª técnica sorteada):

11.1- 7 dias após o afastamento com _____ (2ª técnica sorteada) (Data: ____/____/____):

I- A gengiva doeu nos últimos 7 dias?

(nem um pouco)1-----2-----3-----4-----5(muitíssimo)

II- Você sentiu desconforto ao mastigar?

(nem um pouco)1-----2-----3-----4-----5(muitíssimo)

III- Você sentiu desconforto ao falar?

(nem um pouco)1-----2-----3-----4-----5(muitíssimo)

IV- Você ficou envergonhado e evitou sorrir por achar que os dentes e gengiva estavam feios?

(nem um pouco)1-----2-----3-----4-----5(muitíssimo)

V- A gengiva demorou a cicatrizar?

(nem um pouco)1-----2-----3-----4-----5(muitíssimo)

VI- Você deixou de comer o que gostaria?

(nem um pouco)1-----2-----3-----4-----5(muitíssimo)

VII- Você deixou de praticar suas atividades diárias?

(nem um pouco)1-----2-----3-----4-----5(muitíssimo)

VIII- Você dormiu mal por causa do desconforto na gengiva e dente?

(nem um pouco)1-----2-----3-----4-----5(muitíssimo)

IX- Você considera que seu desempenho no trabalho esteve prejudicado após o procedimento?

(nem um pouco)1-----2-----3-----4-----5(muitíssimo)

X- Você considera que suas relações com amigos ou colegas esteve prejudicada após o procedimento?

(nem um pouco)1-----2-----3-----4-----5(muitíssimo)

XI- Você considera que sua relação com seu namorado/companheiro/esposo esteve prejudicada após o procedimento?

(nem um pouco)1-----2-----3-----4-----5(muitíssimo)

12- Exame clínico 7 dias após afastamento com ____ (2ª técnica sorteada) (Data: ____/____/____):

Profundidade de sondagem:

13				12				11				21				22				23			

Nível clínico de inserção:

13				12				11				21				22				23			

Índice de sangramento gengival:

13	12	11	21	22	23

Índice de placa visível:

13	12	11	21	22	23

Mobilidade dentária:

13	12	11	21	22	23

ANOTAÇÕES: _____

Apêndice 2- Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: Potencial inflamatório de duas técnicas para afastamento gengival utilizadas durante procedimentos protéticos.

Pesquisador: Hugo Ramalho Sarmento

Orientadora: Fernanda Faot

Este é um convite para você participar da pesquisa intitulada “Potencial inflamatório de duas técnicas para afastamento gengival utilizadas durante procedimentos protéticos”, realizada nas instalações da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas.

Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade.

Nessa investigação científica, serão examinadas as gengivas de adultos que apresentam necessidade de reabilitação de dois dentes superiores por meio de coroas protéticas. A coleta de dados será realizada durante os procedimentos de confecção das coroas, feita na clínica de Prótese Dentárias desta Faculdade, com toda técnica, segurança e higiene, conforme normas da Organização Mundial da Saúde e do Ministério da Saúde. Todas as etapas não representam riscos nem gerarão desconforto além do normal daqueles ocorridos durante uma consulta odontológica. Os dados individuais não serão divulgados em nenhuma hipótese, mas os resultados da pesquisa permitirão que seja entendido o comportamento da gengiva diante do afastamento da mesma. Relatamos ainda que você pode, se desejar, não responder a alguma das perguntas do questionário de avaliação.

Os riscos relativos à sua participação nesta pesquisa são mínimos e os benefícios que você terá serão diretos, com a reabilitação de dois dentes.

Todas as informações obtidas serão sigilosas e seu nome não será identificado em nenhum momento. Os dados serão guardados em local seguro e a divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar os voluntários.

Em qualquer momento, se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você terá direito a indenização.

Caso seja detectado algum problema de saúde bucal que exija atendimento odontológico, você será devidamente encaminhado a uma Unidade de Saúde, onde será atendido. O paciente que não desejar fazer parte da pesquisa será atendido, da mesma forma, no prazo máximo de 90 (noventa) dias, pelos pesquisadores responsáveis.

Você ficará com uma cópia deste Termo e toda a dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá perguntar diretamente para o responsável por esta pesquisa, Hugo Ramalho Sarmiento, pelo telefone (53) 81021670. Qualquer dano decorrente da pesquisa será resolvido pelos pesquisadores envolvidos.

Dúvidas a respeito da ética dessa pesquisa poderão ser questionadas ao Comitê de Ética em Pesquisa do Ministério da Saúde no endereço:

Esplanada dos Ministérios – Bloco G, Anexo B – sala 436 b – CEP: 70.058-900
Brasília – DF – Fone: (61) 3315-2951.

Declaro que compreendi os objetivos deste estudo, como ele será realizado, os riscos e benefícios envolvidos na pesquisa “Potencial inflamatório de duas técnicas para afastamento gengival utilizadas durante procedimentos protéticos”, e desta forma, aceito ser voluntário neste estudo.

Pelotas, _____ de _____ de 201____.

Nome em letra de forma

Assinatura ou impressão dactiloscópica

Testemunha