DANIELE LUCCA LONGO

**INFLUÊNCIA DO MEIO DE CONSERVAÇÃO E EFEITO DO TRATAMENTO DE
SUPERFÍCIE NA ANQUILOSE E NA REABSORÇÃO DE TECIDOS MINERALIZADOS
APÓS O REIMPLANTE DE DENTES AVULSIONADOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências. Programa: Odontopediatria
Área de Concentração: Odontopediatria

ORIENTADORA: PROFA. DRA. LÉA ASSED BEZERRA DA SILVA

Ribeirão Preto
2017

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

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

Daniele Lucca Longo

FICHA CATALOGRÁFICA

Longo, Daniele Lucca

Influência do meio de conservação e efeito do tratamento de superfície na anquilose e na reabsorção de tecidos mineralizados após o reimplante de dentes avulsionados.

Ribeirão Preto, 2017.

115p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientadora: Silva, Léa Assed Bezerra

1. Traumatismo dentário
2. Avulsão dentária;
3. Meio de conservação;
4. Reimplante dentário;
5. Tratamento da superfície radicular;
6. Anquilose;
7. Reabsorção Externa por Substituição;
8. Reabsorção Externa Inflamatória.

FOLHA DE APROVAÇÃO

LONGO, DL. **Influência do meio de conservação e efeito do tratamento de superfície na anquilose e na reabsorção de tecidos mineralizados após o reimplante de dentes avulsionados.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientadora: Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva

Data da defesa: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DANIELE LUCCA LONGO

DADOS CURRICULARES

Nascimento	11 de agosto de 1988 – Cravinhos/SP.
Filiação	José Cláudio Longo. Rosana Aparecida Lucca Longo.
2006-2010	Curso de Graduação. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FORP/USP.
2009-2010	Iniciação Científica – Projeto de pesquisa intitulado “Ação de um higienizador de próteses totais à base de própolis frente à <i>Candida sp</i> ” (Bolsa FAPESP).
2011-2012	Curso de Aperfeiçoamento no Atendimento Odontológico a Pacientes Especiais. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FORP/USP.
2011-2013	Curso de Especialização em Odontopediatria. Associação Odontológica de Ribeirão Preto – AORP – Monografia intitulada “Dentinogênese Imperfeita: Relato de casos e análise morfológica dos tecidos dentais mineralizados”.
2011-2013	Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria – nível de Mestrado. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FORP/USP – Dissertação intitulada “Avaliação da citotoxicidade e expressão de citocinas induzidas por resina composta fotopolimerizável”.
2013-2017	Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria – nível de Doutorado. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FORP/USP – Tese intitulada “Influência do meio de conservação e efeito do tratamento de superfície na anquilose e na reabsorção de tecidos mineralizados após o replante de dentes avulsionados”.

A Deus...

Pela graça da vida...

Pela oportunidade que me é dada todos os dias para ser feliz...

Pela família que me proporcionou ter...

Pelos amigos sinceros que me presenteou...

Pelo caminho saudável que me guia...

Pelas conquistas alcançadas...

E pelas vitórias que estão por vir!

Aos meus amados pais **José Cláudio Longo** e **Rosana Aparecida Lucca Longo**...

Vocês são meu maior exemplo de simplicidade,

honestidade, caráter e amor.

Agradeço a vocês por não medirem esforços para
investir na minha educação e me incentivar a continuar estudando
sempre.

Tenho muito orgulho de ser sua filha. Essa conquista
também é de vocês.

Amo vocês!

Às minha queridas irmãs **Graziele Lucca Longo** e **Franciele Lucca Longo**... minhas
verdadeiras aliadas.

Obrigada pelo amor, companheirismo, cumplicidade e incentivo.

Por sermos tão diferentes e iguais ao mesmo tempo.

Por sermos três, e sermos uma. Por serem lindas, por dentro e por fora. Agradeço
por poder dividir com vocês tudo em minha vida.

Amo vocês!

A todos os meus familiares e amigos que sempre torceram por mim!

À Profª. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva, por ter me recebido como aluna e me acolhido na Odontopediatria. Pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, por acreditar na minha capacidade, e pelos desafios propostos. Obrigada pelos ensinamentos, confiança e pela contribuição imensurável na minha formação científica. É uma honra poder contar com a sua ajuda e experiência. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva, pela forma gentil e atenciosa que sempre me recebe. Muito obrigada pela disponibilidade, paciência, apoio e pelas contribuições tão pertinentes, que foram fundamentais para a realização desse trabalho. Agradeço pelas vezes que dedicou o seu tempo me ajudando e por transmitir seus conhecimentos e experiências profissionais. Expresso meu sincero agradecimento e o meu profundo respeito.

Ao Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho, grande exemplo de dedicação, respeito e amor à profissão. Professor, meu sincero agradecimento pela contribuição à minha formação profissional e por todos os seus preciosos ensinamentos que serão sempre lembrados por mim.

À Profª. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuani, por não medir esforços para me ajudar durante a fase experimental desse trabalho e por sempre me receber com tanta generosidade. Agradeço pela sua colaboração e agradável convivência. Muito obrigada!

MEUS AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, na pessoa do atual Reitor, **Prof. Dr. Marco Antônio Zago** e do Vice-Reitor, **Prof. Dr. Vahan Agopyan**.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da atual Diretora, **Profª. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva** e do Vice-Diretor, **Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior**.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Coordenadora, **Profª. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato** e da Vice-Coordenadora **Profª. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**.

Aos professores do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo: **Profª. Dra. Aldevina Campos de Freitas**, **Profª. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz**, **Profª. Dra. Andara de Rossi Daldegan**, **Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano**, **Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho**, **Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira**, **Profª. Dra. Kranya Victoria Díaz Serrano**, **Profª. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**, **Profª. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuari**, **Profª. Dra. Maria da Conceição Pereira Saraiva**, **Profª. Dra. Maria Cristina Borsato**, **Profª. Dra. Mírian Aiko Nakane Matsumoto**, **Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho** e **Profª. Dra. Raquel Assed Bezerra da Silva Segato** pelos valiosos ensinamentos durante a minha formação acadêmica e científica. Pela seriedade e profissionalismo com que desempenham a função de ensinar.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto: **Carmo Eurípedes Terra Barreto**, **Fátima Aparecida Jacinto Daniel**, **Fátima Rizóli**, **Filomena Leli Placciti**, **Marco Antônio do Santos**, **Matheus Morelli Zanela**, **Dra. Marília Pacífico Lucisano Politi**, **Micheli Cristina Leite Rovanholo**, **Nilza Letícia Magalhães**, **Dr. Francisco Wanderlei Garcia de Paula e Silva**, **Dra. Carolina Paes Torres Mantovani**, **Rosemary Alves**, pela disponibilidade, atenção e convivência agradável.

À **Dra. Marília Pacífico Lucisano** pelo despretensioso apoio oferecido, pelas conversas agradáveis e por ser um exemplo de amiga. Obrigada por participar da minha vida. Gosto muito de você, minha querida!

À **Micheli Cristina Leite Rovanholo**, obrigada pela simpatia com que sempre me recebeu, por sempre estar à disposição em ajudar. Agradeço pelo convívio agradável e carinho.

À **Nilza Letícia Magalhães**, minha companheira de laboratório, obrigada pela disponibilidade, prestatividade e ajuda dispensada a mim durante todo o período em que realizei o experimento no laboratório. Você é uma pessoa muito iluminada!

Aos funcionários, **José Aparecido Neves do Nascimento, Vera do Nascimento Scandelai e Karina Dadalt Quaglio**, pela convivência agradável e pelo apoio nas atividades clínicas.

Aos funcionários, **Aline Aparecida Ferraresi Tiballi, Antônio Massaro e Antônio Sérgio Aparecido Mesca**, por serem sempre tão atenciosos comigo no período em que estive no biotério. Muito obrigada por toda ajuda, disponibilidade e pela colaboração no cuidado com os animais durante todo o período experimental desta pesquisa.

Às minhas amigas **Ana Caroline Fumes, Priscilla Coutinho Romualdo e Kêssia Suênia Fidelis de Mesquita** por compartilhar momentos maravilhosos, por dividir experiências e dificuldades, pela amizade verdadeira. Saibam que vocês são e sempre serão especiais para mim.

Aos Pós-Graduandos **Ana Caroline Fumes, Carolina Maschietto Pucinelli, Daniela Silva Barroso, Driely Barreiros, Elaine Machado Pinguero, Fernanda Vicioni Marques, Francine Lorencetti da Silva, Juliana Aird, Karla Orfelina Carpio Horta dos Reis, Larissa Nogueira Soares Ribeiro, Marjorie Ayumi Omori, Patrícia Monteiro, Paula Regina Ávila Silvano, Priscilla Coutinho Romualdo e Silvana Aparecida Fernandes Polizeli**, pela convivência agradável e por todas as experiências, dificuldades e alegrias compartilhadas. Aos demais Pós-Graduandos do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. Foi um privilégio compartilhar meu tempo com vocês!

À **Profª. Dra. Erika Calvano Küchler**, pela forma alegre e carinhosa com que sempre me acolhe. Sou grata pela sua contribuição na minha formação acadêmica e científica e por estar sempre à disposição para ajudar.

À secretária do curso de Especialização de Ortodontia **Rosemary Alves de Sá** pela agradável convivência e formatação deste trabalho.

À **CAPES**, pelo suporte científico e financeiro fundamentais para a realização deste trabalho.

RESUMO

Longo DL. **Influência do meio de conservação e efeito do tratamento de superfície na anquilose e na reabsorção de tecidos mineralizados após o reimplante de dentes avulsionados.** Ribeirão Preto, 2017. 115p. [Tese de Doutorado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2017.

O tratamento preconizado para dentes permanentes avulsionados devido a traumatismos dentários em crianças é o reimplante dental. Entretanto, sabe-se que o sucesso após o reimplante depende, especialmente, do tempo em que o dente permanece fora do alvéolo e do meio de conservação no qual o dente é armazenado. Nesse sentido, para que se tenha sucesso após o reimplante faz-se necessário que o dente seja imediatamente reimplantado e/ou seja mantido em um meio capaz de manter a vitalidade das células da superfície radicular. Se isso não for possível, o tratamento da superfície radicular deverá ser instituído com o objetivo de prevenir a reabsorção radicular. Dessa maneira, esta pesquisa teve como primeiro objetivo avaliar a influência de diferentes meios de conservação para dentes avulsionados, por meio de uma revisão sistemática, com a finalidade de estabelecer se há um consenso sobre o meio mais adequado para conservação capaz de prevenir sequelas como anquilose e reabsorção dentária. A seguir, o segundo objetivo desse estudo foi testar o Denosumab, um anticorpo monoclonal anti-RANKL, como substância para o tratamento tópico da superfície radicular, a fim de evitar a anquilose e a reabsorção dentária por substituição. Para tanto, foram utilizados 36 incisivos superiores direitos de ratos submetidos à extração cirúrgica, manutenção em meio extra-alveolar seco por 60 minutos e posterior reimplante. No grupo I, controle positivo, foi realizado o reimplante tardio sem tratamento de superfície; nos grupos II e III, grupos experimentais, previamente ao reimplante tardio foi realizado o tratamento da superfície radicular com solução de Denosumab a 60 mg/mL e a 30 mg/mL, respectivamente, por 10 minutos. Os canais radiculares dos animais dos três grupos foram preenchidos com pasta à base de hidróxido de cálcio, via retrógrada, e em seguida os dentes foram reimplantados. Decorridos 15 e 60 dias do reimplante, os animais foram submetidos à eutanásia e as peças, contendo dente e osso, foram removidas para o processamento histotécnico. A seguir cortes histológicos foram realizados, corados por hematoxilina e eosina (HE), para descrição das características da superfície dentária e do ligamento periodontal e para mensuração do comprimento (perímetro) da anquilose e/ou reabsorção por substituição e das áreas de reabsorção dentária, em microscopia de luz e, para mensuração da área do ligamento periodontal, em microscopia de fluorescência. Espécimes sequenciais foram analisados por meio de coloração de Brown & Brenn modificada para identificação de micro-organismos e imunohistoquímica para identificação dos marcadores RANKL, OPG e Periostina (PRT). As análises foram realizadas de forma descritiva e quantitativa. Dados quantitativos

foram submetidos à análise estatística por meio do teste paramétrico ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey e dos testes não-paramétricos de qui-quadrado e exato de Fisher, com nível de significância de 5%. Ao final da revisão sistemática da literatura pudemos concluir que não há evidência para estabelecer qual o melhor meio de conservação para dentes avulsionados. Dentre os meios que foram encontrados estão a água de coco, água da torneira, leite de soja, leite integral, solução salina, saliva, própolis, soro fisiológico, solução Euro-Collins, solução salina balanceada de Hank's (HBSS) e Viaspan®. Ainda que esta revisão tenha sido conduzida em modelo animal experimental, a baixa qualidade dos estudos bem como a sua heterogeneidade indicam que a extrapolação para humanos deva ser cautelosa. No estudo experimental em modelo animal, o tratamento de superfície com Denosumab a 60 mg/mL preveniu a anquilose, a reabsorção por substituição e a reabsorção dentária, após 60 dias, comparado com o grupo sem tratamento. A coloração de Brown & Brenn evidenciou uma menor contaminação nos tecidos mineralizados quando do tratamento de superfície com Denosumab, independente da concentração utilizada. Com relação à imunohistoquímica, o tratamento com Denosumab inibiu a síntese de RANKL sem modular OPG. A Periostina foi observada no ligamento periodontal dos dentes reimplantados. Porém, essa marcação estava ausente nas áreas de anquilose, em ambos os períodos experimentais, indicando que durante o processo de anquilose a síntese de periostina é inibida, o que resulta na fusão do osso à superfície radicular.

Palavras-chave: Traumatismo dentário; Avulsão dentária; Meio de conservação; Reimplante dentário; Tratamento da superfície radicular; Anquilose; Reabsorção Externa por Substituição; Reabsorção Externa Inflamatória.

ABSTRACT

Longo DL. **Influence of the storage medium and effect of root surface treatment on ankylosis and resorption of mineralized tissues after tooth replantation.** Ribeirão Preto, 2017. 115p. [Tese de Doutorado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2017.

The treatment of choice for permanent dental avulsion is replantation. However, it is known that the success of the repair after replantation depends especially on the extracellular and the storage medium in which is stored the tooth. Accordingly, in order to have success after replantation is necessary that the tooth is replanted immediately and/or to be kept in a medium capable of maintaining the cell's vitality of the root surface. If that is not possible, treatment of the radicular surface should be done in order to prevent radicular resorption. Thus, the first aim was to perform a systematic review to evaluate the *in vivo* effectiveness of different storage media for avulsed teeth. So, the second aim of this study is to test the substance as Denosumab, a monoclonal antibody, for the topical treatment of the root surface in order to prevent dental ankylosis and replacement resorption. For this, we used 36 rat incisors rights, extracted and replanted, and divided into: group I, positive control, delayed replantation without root surface treatment; groups II and III, experimental groups, delayed replantation without root surface treatment with Denosumab 60 mg/mL and 30 mg/mL, respectively, for 10 minutes. The canals were filling with calcium hydroxide and the teeth were replanted. After periods of 15 and 60 days of the replantation, the animals will be euthanized. Then, samples are removed and processed for microscopic analysis. Histological sections were performed, stained with hematoxylin and eosin, to describe the characteristics of the dental surface and the periodontal ligament and to measure the length of ankylosis, replacement resorption and dental resorption by conventional microscopy, and for the measure the area of periodontal ligament, by fluorescence microscopy. Sequential specimens were analyzed by Brown & Brenn, for localization of bacteria; and marked by immunohistochemistry for RANKL, OPG and Periostin (PRT). The analysis were displayed qualitatively or quantitatively. Data were subjected to statistical analysis by one-way ANOVA and the Tukey post-test and by chi-square and Fisher's exact tests. The significance level was set at 5%. The systematic review does not provide enough evidence to determine the best storage medium to achieve successful tooth replantation. This systematic review has identified many storage media that have been used to preserve avulsed teeth, including coconut water, tap water, soy milk, whole milk, saline solution, saliva, propolis, physiologic saline, Euro-Collins solution, HBSS, and Viaspan®. Although this review was conducted in an experimental animal model, a poor quality of the studies as well as their heterogeneity indicates that a human extrapolation should be cautious. In the experimental study in animal model, root surface treatment with Denosumab 60 mg/mL prevented

ankylosis, replacement resorption, and tooth resorption, 60 days after replantation, compared with the untreated group. Brown & Brenn staining showed a lower contamination in the mineralized tissues in the Denosumab surface treatment group, regardless of the concentration used. As for immunohistochemistry, Denosumab inhibited the synthesis of RANKL without modulating OPG. Periostin was observed in periodontal ligament of tooth replanted. However, this labeling was absent in the ankylosis areas, in both experimental periods, indicating that during the ankylosis process, the periostin synthesis is inhibited, resulting in the fusion between bone and root surface.

Keywords: Dental trauma, Tooth avulsion, Storage media, Tooth replantation, Root surface treatment, Ankylosis, Replacement root resorption, Inflammatory root resorption.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	23
CAPÍTULO 1. INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MEIOS DE CONSERVAÇÃO PARA DENTES AVULSIONADOS EM MODELOS ANIMAIS: REVISÃO SISTEMÁTICA	31
CAPÍTULO 2. EFEITO DO TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE RADICULAR COM DENOSUMAB PREVIAMENTE AO REIMPLANTE DENTÁRIO TARDIO	47
CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS	95
ANEXO	113

Introdução

INTRODUÇÃO

O trauma é uma das principais causas de morte de indivíduos de até 40 anos de idade (Eilert-Petersson et al., 1997). Pelo menos quatro milhões de pessoas morrem por trauma a cada ano (Andersson, 2013). Dentre os impactos físicos decorrentes do trauma estão as lesões orais e/ou as lesões corporais. Sabe-se que, as lesões orais ocorrem mais frequentemente durante os primeiros dez anos de vida, diminuindo gradualmente com a idade e são muito raras após os 30 anos, enquanto que as lesões corporais são observadas com mais frequência em adolescentes e são comuns ao longo da vida (Eilert-Petersson et al., 1997; Glendor e Andersson, 2007).

Especificamente em relação às lesões orais, os traumatismos na dentição decídua ocorrem mais frequentemente em crianças entre 2 e 3 anos de idade e na dentição permanente, entre 9 e 10 anos de idade (Andreasen et al., 1995; Andreasen et al., 2007) e as consequências vão desde fraturas coronárias não complicadas a avulsões dentárias, caracterizadas pelo deslocamento do dente no alvéolo (Mori et al., 2007). Em relação ao gênero, há maior prevalência no masculino, sendo as meninas, geralmente, menos acometidas do que meninos (Rocha e Cardoso, 2001; Traebert et al., 2003; Soriano et al., 2004; Granville-Garcia et al., 2006; Cavalcanti et al., 2009; Robson et al., 2009; Bendo et al., 2010; Bonini et al., 2012; Damé-Teixeira et al., 2012; Martins et al., 2012; Francisco et al., 2013; Paiva et al., 2015; Tello et al., 2016). Isso se dá, pois os estudos têm demonstrado que os homens têm maior propensão para esportes de contato e comportamento violento (Zaleckiene et al., 2014; Navabazam e Farahani, 2010). No entanto, foi verificado que as disparidades de gênero estão em declínio à medida que as mulheres estão participando mais ativamente dos esportes (Zaleckiene et al., 2014; Traebert et al., 2006). Dessa forma, em uma recente revisão da literatura concluiu-se que o gênero, como fator predisponente ao traumatismo dentário, está essencialmente relacionado às atividades realizadas, uma vez que a participação no esporte é uma escolha do indivíduo (Lam 2016). Ainda, alguns indivíduos são considerados de maior risco, quando os mesmos sofrem repetidos traumas dentários (Glendor et al., 1996; Borssén e Holm, 1997; Chen et al., 1999; Al-Jundi, 2004; Glendor, 2008; Goettems et al., 2016).

Com respeito aos fatores etiológicos do traumatismo dentário, deve-se levar em consideração a idade do indivíduo. Em crianças pré-escolares, as quedas constituem a causa

mais comum das lesões orais, enquanto em crianças em idade escolar, as lesões mais frequentes são causadas por esportes, especialmente o basquetebol associado a não utilização de protetores bucais e outras brincadeiras, aliadas a uma característica anatômica peculiar à idade, que é a protrusão fisiológica dos incisivos centrais superiores (Järvinen, 1979; Oikarinen e Kassila, 1987; Cohenca et al., 2007; Frontera et al., 2011; Black et al., 2017). No entanto, a maioria das atividades esportivas apresenta um risco associado aos traumatismos dentários devido à possibilidade de quedas, colisões, e contato com superfícies duras (Nicolau et al., 2001).

Outros fatores de risco relacionados ao traumatismo dentário incluem o fato de o paciente apresentar uma cobertura labial inadequada (lábio superior curto) e um overjet acentuado (maior que 3 a 4 mm) (Inouye e McGraw, 2015; Ain et al., 2016). Em adolescentes e adultos jovens, as agressões e acidentes de trânsito são os fatores etiológicos mais comuns (Glendor, 2009; Guedes et al., 2010). Neste grupo, as lesões orais podem também estar relacionadas com o consumo de álcool (Perheentupa et al., 2001; Santos et al., 2010) e ocorrem mais frequentemente durante as horas de lazer e aos finais de semana (Eilert-Petersson et al., 1997; Santos et al., 2010). Sabe-se que a incidência de traumatismo dentário em crianças varia, na maioria dos estudos, de 1% a 3% na população (Andreasen et al., 2007), podendo atingir cerca de 10% da população (Pavek e Radtke, 2000).

As avulsões dentárias constituem de 0,5 a 3% das lesões traumáticas na dentição permanente (Glendor et al., 1996; Andreasen e Andreasen, 2007) e de 7 a 13% na dentição decídua (Andreasen, 1970; Andreasen e Andreasen, 2007) e são, bem como as intrusões, as lesões mais graves porque envolvem danos à polpa e ao ligamento periodontal (Glendor et al., 1996; Andreasen et al., 2006; Andreasen e Andreasen, 2007). O tratamento preconizado para as avulsões dentárias é o reimplante (Alexander, 1956; Andreasen et al., 1995; Andersson et al., 2012). O reimplante dentário constitui o ato de reposicionar o dente avulsionado em seu alvéolo (Alexander, 1956) e a conduta a ser estabelecida está na dependência do estágio de formação radicular (ápice aberto ou fechado) e na viabilidade das células do ligamento periodontal (Andersson et al., 2012). A viabilidade dessas células depende do meio de conservação em que os dentes serão mantidos e do tempo extra-alveolar (Andersson et al., 2012). Sendo assim, quando o dente avulsionado é reimplantado imediatamente ou é armazenado em meios de conservação compatíveis para a manutenção da viabilidade das células do ligamento periodontal, aumenta-se consideravelmente as

chances de sucesso (Andreasen, 1980*a*; Andreasen, 1981; Andreasen e Kristerson, 1981*b*; Andreasen et al., 1995; Andersson et al., 2012). Para esses casos o reimplante é considerado imediato. Por outro lado, após 60 minutos extra-alveolar, se os dentes avulsionados forem mantidos em meios de conservação não fisiológicos ou ainda, mantidos em meio seco, serão considerados como reimplante tardio (Lindskog et al., 1985; Andersson et al., 2012). Nesses casos, as complicações decorrentes da tentativa de reposicionamento do dente no alvéolo são comumente observadas (Andreasen e Kristerson, 1981*b*).

Dentre essas complicações estão a anquilose, caracterizada pela fusão do osso alveolar com a raiz radicular, cujo primeiro sinal é um som alto à percussão, seguido por diminuição da mobilidade, reabsorção por substituição e infra-oclusão em indivíduos em crescimento (Andersson et al., 1984; Andreasen, 1985; Lindskog et al., 1985; Hammarstöm et al., 1986*c*; Tronstad, 1988; Hammarstöm, Lindskog, 1992; Barret e Kenny, 1997; Ne et al., 1999). Assim, um dente anquilosado é continuamente reabsorvido e substituído por osso, sendo a taxa de reabsorção relacionada com a idade. Indivíduos de 8 a 16 anos de idade, após traumatismo dentário, apresentaram a taxa de reabsorção radicular significativamente maior em comparação com pacientes de 17 a 39 anos de idade (Andersson et al., 1989). Em relação à infra-oclusão severa de um dente anquilosado, sabe-se que ela pode comprometer o crescimento alveolar e facial podendo interferir esteticamente na reabilitação futura. Nesses casos, a exodontia é indicada para se evitar maloclusões, tais como a mordida aberta, hábitos deletérios de postura de língua e inclinação dos dentes adjacentes (Malmgren e Malmgren, 2002). Outros tratamentos apropriados incluem decoronação, autotransplante, pontes-fixas retidas por resina, próteses removíveis, fechamento de espaço por meio de ortodontia e osteotomias. Após o término do crescimento, o tratamento com implantes também deve ser considerado (Andersson et al., 2012).

Embora o processo de reparo após o reimplante venha sendo amplamente estudado em ratos (Hellsing et al., 1993; Nishioka et al., 1998; Ricieri et al., 2009; Saito et al., 2011; Vilela et al., 2012; Gomes et al., 2015; Matos et al., 2016; Carvalho et al., 2017; Pigatto Mitihiro et al., 2017), cães (Trope et al., 1992; Levin et al., 2001; Iqbal e Bamass, 2001; Bryson et al., 2002; Kirakozova et al., 2009; Guzman-Martinez et al., 2009; de Paula Reis et al., 2014; Zanetta-Barbosa et al., 2014; Barbizam et al., 2015), macacos (Caffesse et al., 1977; Andreasen, 1980*a,b*; Andreasen e Kristerson, 1981*a,b*; Panzarini et al., 2007; Panzarini et al., 2012*a*) e humanos (Alexander, 1956; Andreasen e Hjorting-Hansen, 1966; Andersson et al.,

1989; Andreasen et al., 1995; Keklikoglu et al., 2006; Biagi, 2014), situações adversas, como a anquilose e reabsorção por substituição, ainda são frequentemente observadas em dentes avulsionados e reimplantados, principalmente nos dentes mantidos em meio extra-alveolar seco ou inadequado (Lindskog et al., 1985; Pettiette et al., 1997).

O sucesso do reparo do dente avulsionado depende, especialmente, do tempo extra-alveolar e do meio de conservação em que é armazenado, sendo fundamental a manutenção da vitalidade das células na superfície radicular (Andreasen, 1980a; Andreasen, 1981; Andreasen e Kristerson, 1981a; Andreasen et al., 1995; Andersson et al., 2012). Entretanto, na prática clínica esta situação dificilmente é conseguida, pois falta conhecimento por parte dos responsáveis sobre como armazenar o dente avulsionado (Oliveira et al., 2007; Al-Asfour e Andersson, 2008; Tzigkounakis et al., 2008; Ozer et al., 2012), bem como o tempo de espera entre o traumatismo dentário e o atendimento odontológico é, muitas vezes, longo (Karande et al., 2012).

Nesse sentido, o tratamento das superfícies radiculares tem sido amplamente investigado no intuito de favorecer o reparo do ligamento periodontal e aumentar as chances de sucesso após o reimplante (Andreasen et al., 1995; Lam et al., 2004; Panzarini et al., 2005; Poi et al., 2007; Gulinelli et al., 2008; Loo et al., 2008; Panzarini et al., 2014a; Zanetta-Barbosa et al., 2014; Yoo et al., 2015), visando principalmente um prognóstico mais favorável para os dentes mantidos fora do alvéolo ou em meio inadequado. Para tanto, há uma vasta relação de substâncias na literatura que hipoteticamente poderiam ser utilizadas para conter essas complicações decorrentes do reimplante, tais como, a formalina e o álcool (Butcher, Vidair; 1955), o ácido cítrico (Polson e Proye, 1982; Klinge et al., 1984), os fluoretos (Shulman et al., 1973; Gulinelli et al., 2008; Panzarini et al., 2014a), a enzima hialuronidase associada ao ácido clorídrico (Nevins et al., 1980), os antibióticos locais e sistêmicos (Sae-Lim et al., 1998; Bryson et al., 2003; Melo et al., 2015; de Souza Gomes et al., 2015), os anti-inflamatórios (Kum et al., 2003; Zanetta-Barbosa et al., 2014), a solução de hipoclorito de sódio (Lindskog et al., 1985), as proteínas derivadas da matriz do esmalte (Iqbal e Bamass, 2001; Wiegand e Attin, 2008; Baltacioglu et al., 2011; Barbizan et al., 2015), a acetazolamida (Mori et al., 2009; 2013) e os bisfosfonados (Thong et al., 2009; Komatsu et al., 2013; Yoo et al., 2015). No entanto, na maioria dos casos o tratamento não inibiu a ocorrência de reabsorção radicular externa (Andreasen et al., 1995; Trope, 2002).

Idealmente, os dentes avulsionados devem ser reimplantados imediatamente (Andersson et al., 2012). Se isso não for possível, o meio de conservação deve ser um meio fisiológico para transporte até o consultório odontológico (Poi et al., 2013). No entanto, estudos têm demonstrado que o reimplante de dentes avulsionados ocorrem mais freqüentemente entre 1 e 4 horas, após a avulsão, caracterizando-os como tardio (Grossman e Ship, 1970; Andreasen e Andreasen, 1994; Panzarini et al., 2003). Assim, substâncias para tratamento da superfície radicular devem também ser investigadas para que seja possível fornecer ao paciente, em ambiente ambulatorial, um tratamento que permita a manutenção do dente na cavidade bucal, mesmo após avulsão e reimplante de dentes mantidos em meio seco e/ou por longos períodos extra-alveolares, como acontece com maior frequência na população (Karayilmaz et al., 2013; Bastos et al., 2015). Ainda, segundo o Guia da Associação Internacional de Traumatologia Dentária (IADT), novos estudos que avaliem meios de transporte/conservação de dentes avulsionados são necessários, pois há uma preocupação no que tange ao reimplante desses dentes devido ao possível risco de anquilose (Andersson et al., 2012).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência de diferentes meios de conservação para dentes avulsionados, por meio de uma revisão sistemática da literatura, com a finalidade de estabelecer se há um consenso sobre o melhor meio de conservação capaz de prevenir sequelas como anquilose e reabsorção dentária (Capítulo 1). A seguir, considerando que o reimplante dentário realizado tardiamente apresenta como efeito adverso a anquilose e a reabsorção externa por substituição, foi avaliado em um modelo animal experimental, se um medicamento que inibe a reabsorção de tecidos mineralizados poderia ser utilizado para aplicação tópica em superfícies radiculares visando impedir esse processo (Capítulo 2).

Capítulo 1. INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MEIOS DE CONSERVAÇÃO PARA DENTES AVULSIONADOS EM MODELOS ANIMAIS: REVISÃO SISTEMÁTICA

CAPÍTULO 1. INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MEIOS DE CONSERVAÇÃO PARA DENTES AVULSIONADOS EM MODELOS ANIMAIS: REVISÃO SISTEMÁTICA

A avulsão dentária constitui um dos tipos mais severos de trauma dentário e consiste no deslocamento completo do dente do seu alvéolo (Andreasen, 1970; Glendor et al., 1996; Andreasen et al., 2006). O tratamento preconizado para as avulsões dentárias é o reimplante (Alexander, 1956; Andreasen et al., 1995). Quando o tratamento instituído não é imediato, o dente avulsionado deve ser mantido em um meio de conservação capaz de manter a viabilidade das células do ligamento periodontal na superfície radicular (Andreasen, 1970; Loe et al., 1961; Andreasen e Kristerson, 1981a; Hammarstrom et al., 1989).

O meio de conservação é fundamental para preservar a viabilidade das células do ligamento periodontal, o que influencia diretamente no prognóstico dos dentes reimplantados (Cardos et al., 2009; Caglar et al., 2010). Embora seja amplamente divulgado que o meio de conservação ideal deveria apresentar um pH adequado, osmolaridade fisiológica e conter nutrientes para manter a viabilidade celular (Poi et al., 2013), ainda não há um consenso sobre qual seria o melhor meio de conservação capaz de prevenir sequelas como a anquilose e a reabsorção externa de substituição.

Assim, o objetivo deste estudo foi realizar uma revisão sistemática visando avaliar *in vivo* a influência de diferentes meios de conservação para dentes avulsionados para prevenir sequelas como anquilose e reabsorção dentária externa.

METODOLOGIA

A estratégia de busca empregou as seguintes combinações dos descritores MeSH (*Medical Subject Headings*) e das palavras-chave: "replantation"[MeSH] AND "tooth avulsion"[MeSH] OR "teeth avulsion" AND "storage media" OR "transportation media" [tw]. A pesquisa bibliográfica incluiu estudos indexados nas seguintes bases de dados: *MedLine* (1966 - Dezembro de 2015), *Web of Science* (1900 - Dezembro de 2015), *Scopus* (1960 - Dezembro de 2015), *Bireme* (1967 - Dezembro de 2015) e *The Cochrane Library* (1990 - December 2015). Uma busca manual adicional foi realizada a fim de buscar possíveis artigos que não foram incluídos nas bases de dados eletrônicas.

A seleção dos estudos foi feita, inicialmente, a partir do título e, em seguida, por meio do resumo, por dois examinadores. Para os estudos potencialmente relevantes que

foram selecionados, uma análise integral do texto foi realizada. Em caso de discordância entre os examinadores, durante este processo de seleção, uma nova análise foi feita para se chegar a um consenso.

A seleção dos títulos e dos resumos foi baseada nos seguintes critérios de inclusão: artigos publicados em língua inglesa e estudos que avaliaram a avulsão dento-alveolar, os meios de conservação, e ainda, o reimplante dentário, em modelo animal.

Os dados relevantes dos estudos selecionados foram extraídos e discutidos nesta revisão, tais como a descrição do desenho do estudo, a composição dos meios de conservação, os resultados e as conclusões. Nos casos em que houve divergência ou discordância de opinião entre os autores, as questões foram discutidas em reunião a fim de se chegar a um consenso.

Para se avaliar criticamente a influência dos meios de conservação, os dados extraídos e as análises estatísticas dos grupos experimentais foram comparados a um controle negativo (reimplante imediato). A anquilose e reabsorção radicular externa por substituição foram os desfechos desfavoráveis avaliados neste estudo, uma vez que são mais comumente relacionados ao reimplante dentário. Dessa forma, os estudos foram agrupados de acordo com o desfecho avaliado e com o método utilizado para mensurá-lo.

Os estudos incluídos foram analisados de acordo com a sua qualidade metodológica. Para esta avaliação foram atribuídos escores de 0 (qualidade mais baixa) até 15 (qualidade mais elevada), a fim de classificar o nível de evidência do estudo e, portanto guiar a interpretação dos resultados. Assim, as características do estudo como definição de grupo controle, análise estatística empregada e descrição dos resultados com clareza, foram levados em consideração. Os critérios clínicos, quando aplicáveis aos modelos animais, foram baseados nas diretrizes da Associação Internacional de Traumatologia Dentária (IADT) (Andersson et al., 2012). Para esta avaliação foram atribuídos pontos a cada item de acordo com sua relevância (Tabela 1.1). Os estudos foram classificados de acordo com o nível (qualidade) de evidência em alto, moderado, baixo e muito baixo nível (qualidade) de evidência (Tabela 1.2), de acordo com a soma dos escores, e com base no sistema GRADE (Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation), que consiste em um sistema desenvolvido para graduar a qualidade das evidências e a força das recomendações em saúde (Guyatt et al., 2011).

Contudo, não foi possível realizar uma meta-análise, pois os estudos incluídos não apresentaram dados suficientemente semelhantes para serem agrupados.

Tabela 1.1. Protocolo para a atribuição de escores aos estudos

Subgrupos	Item	Componente	Classificação	Pontos	Definição
Aspectos clínicos*	1. Diretrizes de tratamento para dentes permanentes avulsionados	Tra tamento endodôntico	Sim Não	1 0	Estudos que realiza ram tra ta mento endodôntico.
		Administra ção sistêmica de antibiótico	Sim Não	1 0	Estudos que administra ram antibióticos sistêmicos.
		Aplica ção de contenção flexível	Flexível para maca cos e cães ou ausência de contenção para ra tos Semi rrígida Rígida	2 1 0	Estudos que realiza ram contenção.
Aspectos metodológicos	2. Amostra	Modelo animal	Maca cos Cães Ra tos	3 2 1	Estudos que utiliza ram roedores rece beram pontua ção mais baixa devido à distância evolutiva dos humanos.
	3. Intervenções	Tempo extra -alveolar	Clareza Ausência de dareza	1 0	Estudos que realiza ram uma descrição clara do tempo extra-alveolar e do tempo de imersão em meio de conserva ção previamente ao reimplante.
		Estágio de formação radicular	Clareza Ausência de dareza	1 0	Estudos que descreveram o estágio de forma ção ra dicular (ápice aberto ou fechado).
	4. Desfechos	Completa mente de finido	Clareza Ausência de dareza	1 0	Estudos que descreveram da ramente o(s) des fecho(s).
	5. Grupo controle	Definição de controle	Clareza Ausência de dareza	1 0	Estudos que não induíram um grupo controle ou não o descreveu claramente rece beram pontua ção mais baixa.
	6. Método Esta tístico	Método estatístico utilizado	Adequado Parcialmente Inadequado ou ausente	2 1 0	A análise esta tística foi satisfatória para avaliar os dados.
	7. Resultados	Apresenta ção dos dados	Adequado Parcialmente Inadequado	2 1 0	A descrição dos resultados foi clara e os dados entre os grupos foram totalmente apresentados.

Tabela 1.2. Critérios utilizados para classificar o nível (qualidade) de evidência dos estudos incluídos

Escores GRADE	Nível (qualidade) de evidência GRADE	Interpretação
13–15	Alto	Há forte confiança de que o verdadeiro efeito esteja próximo daquele estimado.
10–12	Moderado	É provável que o verdadeiro efeito se encontre próximo da estimativa do efeito, mas há a possibilidade de que seja substancialmente diferente.
6–9	Baixo	O verdadeiro efeito pode ser substancialmente diferente da estimativa do efeito.
0–5	Muito baixo	É provável que o verdadeiro efeito seja substancialmente diferente da estimativa do efeito.

Nota: Baseado no Sistema GRADE (*Grading of Recommendations Assessment, Development, and Evaluation*) (Guyatt et al., 2011).

RESULTADOS

A estratégia de busca revelou 254 estudos. Especificamente, foram obtidos 81 estudos da base de dados PubMed, 74 do Scopus, 61 do Web of Science, 38 da Bireme e 0 da Cochrane. Assim, após a exclusão dos estudos que se encontravam em duplicata nessas bases de dados, foram selecionados 157 estudos. Conforme a avaliação mais detalhada dos títulos e resumos, foram excluídos 150 estudos e 7 referências foram identificadas como potencialmente relevantes. Após uma revisão adicional dos resumos, em relação aos critérios de inclusão, foram, então, selecionados 6 artigos para análise final do texto completo (Figura 1.1).

Figura 1.1. Fluxograma do processo de busca e seleção dos estudos sobre meios de conservação e reimplante dentário, conforme as diretrizes para revisões sistemáticas e meta-análise (PRISMA, sigla do inglês Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analysis) (Moher et al., 2009).

As características dos artigos selecionados são apresentadas no Quadro 1.1. Esse quadro descreve o modelo animal utilizado, o tamanho da amostra (número de dentes e/ou raízes), o tipo de dente, os meios de conservação, o estágio de formação radicular, o material utilizado para tratamento endodôntico, o tipo de contenção utilizado, o tempo de permanência no meio de conservação, a consistência da dieta e a preservação após o reimplante dentário. Em relação ao modelo animal, um dos estudos avaliou dentes de ratos (Mori et al., 2010), um avaliou os dentes de macacos (Andreasen, 1981) e os outros quatro

avaliaram dentes de cães. Em dois, dos seis estudos selecionados, o estágio de formação radicular não foi relatado (Sottovia et al., 2010; Buttke e Trope, 2003).

Apenas quatro estudos incluíram um grupo em que os dentes foram mantidos em meio seco. Foram testados onze tipos de meios de conservação, dentre eles: água de coco, água da torneira, leite de soja, leite integral, solução salina, soro fisiológico, saliva, própolis, solução Euro-Collins (meio para preservação hipotérmica de órgãos coletados para fins de transplante), solução salina balanceada de Hank's (HBSS) e Viaspan®. O leite foi o meio de armazenamento mais estudado (Mori et al., 2010; Sottovia et al., 2010; de Paula Reis et al., 2014).

Quatro estudos avaliaram a anquilose como desfecho. A conservação em leite (Mori et al., 2010; de Paula Reis et al., 2014) ou em solução de Euro-Collins (Sottovia et al., 2010) mostrou resultados semelhantes aos do reimplante imediato. Por outro lado, a conservação em leite de soja apresentou resultado significativamente pior do que o reimplante imediato. Buttke et al. (2003) não avaliaram a influência dos meios de conservação na prevenção da anquilose, em comparação com o reimplante imediato. O estudo de Andreasen (1981) não incluiu dados sobre a anquilose.

Cinco estudos avaliaram a reabsorção radicular externa por substituição como desfecho. O leite de soja, a água de coco (de Paula Reis et al., 2014), o leite (Mori et al., 2010; de Paula Reis et al., 2014), o própolis (Mori et al., 2010) e a solução de Euro-Collins (Sottovia et al., 2010) apresentaram resultados semelhantes aos do reimplante imediato. Os dentes avulsionados mantidos em meio seco em todos os estudos e em leite no estudo de Sottovia et al. (2010) apresentaram resultados significativamente piores que o reimplante imediato. Buttke et al. (2003) não avaliaram a influência dos meios de conservação na prevenção da reabsorção radicular externa por substituição, em comparação com o reimplante imediato. Andreasen (1981) não comparou os diferentes meios de conservação testados com o reimplante imediato.

Quadro 1.1. Descrição dos estudos selecionados

Estudo	Modelo animal	Animais/ Dentes ou Raízes #	Tipo de Dente	Meios de conservação	Estágio de formação radicular	Material utilizado para tratamento endodôntico	Método de contenção	Tempo de imersão no meio de conservação	Consistência da dieta	Preservação (dias)	Avaliação do desfecho
de Paula Reis et al. (2014)	Cães (Beagle)	10/40	Incisivo	- Água de coco - Leite de soja - Leite integral - Solução salina	Ápice fechado	O tratamento endodôntico não foi realizado	Contenção semirrígida durante 14 dias	50 min	Não foi descrita	28	-A análise de μ CT -A análise histomorfométrica com software Moyic Images Advanced 3.2
Mori et al. (2010)	Ratos (Wistar)	60/60	Incisivo superior direito	- Solução de própolis a 20% - Leite - Meio seco - Reimplante imediato	Ápice aberto	Pasta à base de hidróxido de cálcio	Nenhuma contenção foi aplicada	60 min ou 6 h	Dieta granulada	15 e 60	-A análise histopatológica -A análise morfométrica com ImageTool
Sottovia et al. (2010)	Cães (Mongrel)	4/80	Incisivo e pré-molar	- Reimplante imediato - Meio seco - Leite bovino integral - Solução Euro-Collins	Não foi descrito	Guta-percha e cimento à base de hidróxido de cálcio	Contenção realizada com fio ortodôntico e resina composta fotopolimerizável	8 h	Dieta macia nas primeiras 72 h	90	-A análise histopatológica - A análise morfométrica com o software KS 300 image analysis
Buttke et al. (2003)	Cães (Mongrel)	2/28	Pré-molar	-HBSS -Viaspan® -HBSS e Viaspan® suplementados com catalase bovina (100 U mL ⁻¹)	Não foi descrito	O tratamento endodôntico foi realizado, porém o material utilizado não foi descrito.	Nenhuma contenção foi aplicada	0,75 h, 5 h, ou 26 h	Dieta macia	60	- A análise histopatológica
Pettiette et al. (1997)	Cães (Beagle)	4/104	Incisivo e pré-molar	- Reimplante imediato - Meio seco - HBSS - Viaspan® - Meio condicionado (sobrenadante da cultura confluyente de fibroblastos gengivais humanos)	Ápice fechado	O tratamento endodôntico foi realizado, porém o material utilizado não foi descrito.	Contenção durante 14 dias	30 min	Dieta macia durante 14 dias	180	- A análise histopatológica
Andreasen (1981)	Macacos (Vervet)	75/150	Incisivo lateral inferior	- Água de torneira - Soro fisiológico - Saliva - Meio seco	Ápice fechado	O tratamento endodôntico não foi realizado	Nenhuma contenção foi aplicada	0 min 18 min 30 min 60 min 90 min 120 min	Dieta em pó	56	- A análise histopatológica

A Tabela 1.3 apresenta os níveis (qualidade) de evidência dos estudos incluídos nesta revisão. Dos estudos selecionados, um estudo foi classificado como nível de evidência muito baixo (Buttke e Trope, 2003), quatro foram classificados como baixo nível de evidência (Andreasen, 1981; Mori et al., 2010; Sottovia et al., 2010; de Paula Reis et al., 2014) e um estudo foi classificado como nível de evidência moderado (Pettiette, et al., 1997).

Tabela 1.3. Avaliação da qualidade dos estudos selecionados

Componente	Critério	de Paula Reis et al., 2014	Mori et al., 2010	Sottovia et al., 2010	Buttke et al., 2003	Pettiette et al., 1997	Andreasen, 1981
1. Diretrizes de tratamento para dentes permanentes avulsionados	Aplicação de contenção flexível	1	2	0	0	2	0
	Administração sistêmica de antibiótico	0	1	1	0	0	0
	Tratamento endodôntico	0	1	1	1	1	0
2. Amostra	Modelo animal	2	1	2	2	2	3
3. Intervenções	Tempo extra-alveolar	0	0	0	0	1	1
	Estágio de formação radicular	1	1	0	0	1	1
4. Desfechos	Completamente definido	1	1	0	0	0	1
5. Grupo controle	Definição de controle	1	1	1	0	1	1
6. Método estatístico	Método estatístico utilizado	1	1	1	1	1	1
7. Resultados	Apresentação dos dados	1	0	1	1	1	1
Total de pontos		8	9	7	5	10	9
Nível (qualidade) de evidência		Baixo	Baixo	Baixo	Muito baixo	Moderado	Baixo

DISCUSSÃO

A preservação da viabilidade das células do ligamento periodontal e do cimento na superfície radicular é de fundamental importância para o sucesso do reimplante dentário (Loe e Waerhaug, 1961; Andreasen, 1981; Hammarstrom et al., 1989; Andreasen, 1996). A IADT recomenda que os dentes avulsionados sejam imediatamente reimplantados, a fim de aumentar a viabilidade dessas células (Andersson et al., 2012). No entanto, nos casos em que o reimplante imediato não é possível de ser realizado, o meio de conservação do dente avulsionado pode influenciar diretamente no desfecho do reimplante.

Esta revisão sistemática objetivou identificar qual o meio de conservação utilizado atualmente pode levar a desfechos semelhantes ao reimplante imediato. Uma limitação desse estudo foi a impossibilidade de se realizar uma meta-análise, uma vez que os dados avaliados eram extremamente heterogêneos e, ainda, os estudos apresentavam inúmeras limitações metodológicas que impediam a identificação do melhor meio de conservação para a preservação de células do ligamento periodontal, previamente ao reimplante. Destarte, foi realizada apenas uma descrição qualitativa das características dos estudos, dos seus principais achados e, então, foi apresentado o nível de evidência para ilustrar a literatura atual no que tange a esse tema.

Dos seis estudos selecionados, apenas um estudo utilizou roedores para avaliar a influência de diferentes meios de conservação (Mori et al., 2010). Os ratos têm uma taxa metabólica acelerada comparada à dos humanos (Moretton et al., 2000) e seus incisivos têm crescimento contínuo e são extremamente curvos, o que dificulta as extrações atraumáticas (Schour et al., 1967). No entanto, o rato representa um animal experimental acessível, de fácil manuseio e sua manutenção é muito mais barata quando comparada a dos primatas e cães (Consolaro, 2007). A utilização de ratos em experimento oferece vantagens, como a facilidade de obtenção dos animais, devido ao curto tempo de procriação e às ninhadas com muitos filhotes. Essas características permitem uma padronização do experimento, uma facilidade de repetições e amostras com grande número de animais (Consolaro, 2007). Os cães foram utilizados em quatro dos estudos selecionados. Por várias razões, os cães são considerados um modelo melhorado em relação aos roedores para a realização de pesquisas envolvendo trauma dentário (Sae-Lim et al., 1998; Yanpiset e Trope, 2000; Levin et al., 2001; Bryson et al., 2002; Cunha et al., 2002; Ritter et al., 2004; Felipe et al., 2006). Os cães têm um processo de reparo semelhante ao dos humanos, bem como a curvatura dos incisivos

também é semelhante as do incisivo humano (Citrome et al., 1979). No entanto, Andreasen e Andersson (2011) relataram que o delta apical em dentes maduros é um fator limitante nos modelos de cães, o que torna as respostas de cicatrização e de reparo difíceis de serem comparadas as dos seres humanos (Andreasen e Andersson, 2011). Esses autores também relataram que os macacos são modelos melhores que os cães, com processo de cicatrização e reparo semelhantes aos dos seres humanos. No entanto, apenas um estudo incluído nesta revisão utilizou macacos como modelo animal (Andreasen, 1981). Apesar disso, o modelo murino ainda é o mais utilizado nos estudo de doenças ósseas ou avaliação da repercussão de medicamentos e universalmente aceito como de menor custo e ético (Consolaro, 2007; Santamaria Jr., 2010).

Nos seres humanos, a contenção dos dentes avulsionados é considerada a melhor prática para manter o dente reposicionado na posição correta, bem como para proporcionar conforto ao paciente e melhorar a função dos dentes reimplantados. No entanto, a recomendação para a contenção em pesquisa experimental animal depende das espécies utilizadas, e os pesquisadores da área de traumatologia dentária devem conhecer essas diferenças quando do reimplante dentário em modelos animais. Em roedores, a contenção dos dentes não é necessária após o reimplante devido à anatomia dos incisivos, cuja curvatura ajuda na manutenção do dente no interior do alvéolo dental. Um estudo demonstrou que a contenção, nesses animais, pode promover o deslocamento do dente em direção à porção mesial da cavidade bucal e favorecer a ocorrência de anquilose e reabsorção na área (Okamoto e Okamoto, 1995). Dos seis estudos incluídos nesta revisão, um estudo (Mori et al., 2010) utilizou roedores e não realizou o procedimento de contenção dos dentes. Similarmente aos humanos, a contenção dental após reimplante dentário é necessária em cães e macacos.

A escolha do tratamento para dentes avulsionados está relacionada à condição do ápice radicular do dente avulsionado (maturidade da raiz), ou seja, se o dente apresenta-se com ápice aberto (dente com rizogênese incompleta) ou com ápice fechado (dente com rizogênese completa) e à condição das células do ligamento periodontal (Andersson et al., 2012). Em dois, dos seis estudos, a maturidade da raiz não estava claramente descrita. Assim, esses estudos receberam uma pontuação baixa quando da análise do nível (qualidade) de evidência.

O tratamento endodôntico após a avulsão dentária é indicado para dentes com rizogênese completa (ápice fechado) (Trope et al., 1992). Para os dentes com rizogênese incompleta (ápice aberto), o tratamento endodôntico deve ser evitado em seres humanos, uma vez que há possibilidade de revascularização. Nesses casos, o tratamento endodôntico é apenas recomendado se houver evidência clínica ou radiográfica de necrose pulpar e contaminação dos canais radiculares durante o período de acompanhamento. Em modelos experimentais de animais, independentemente de o dente apresentar-se com ápice aberto ou fechado, o tratamento endodôntico é recomendado a fim de se evitar a reabsorção interna inflamatória (Andreasen e Kristerson, 1981a; Pettiette et al., 1997). Assim, os estudos realizados em dentes de animais e sem tratamento endodôntico receberam uma pontuação baixa quando da análise do nível (qualidade) de evidência.

A antibioticoterapia sistêmica em animais é necessária para prevenir infecções (Pettiette et al., 1997). No entanto, a recomendação para a administração sistêmica de antibióticos, após o reimplante dentário, ainda é questionável em humanos (Hinckfuss e Messer, 2009; Andreasen et al., 2010), uma vez que os estudos clínicos não demonstraram evidência da sua importância, conforme apresentado nas diretrizes da IADT (Andersson et al., 2012). Por outro lado, os estudos têm demonstrado efeitos positivos da antibioticoterapia sistêmica no reparo dos tecidos periodontal e pulpar (Sae-Lim et al., 1998; Hammarstron et al., 1986a). Por esta razão, recomenda-se a utilização de antibióticos após o reimplante de dentes em modelos animais. Assim, estudos que não relataram a administração de antibioticoterapia receberam escores baixos.

Os achados desta revisão são limitados a modelos animais e a extrapolação para seres humanos deve ser considerada com cautela. Apesar disso, a evidência sobre qual meio de conservação seria o mais adequado para se manter os dentes avulsionados é, muitas vezes, baseada em relatos de casos. Ainda, estudos clínicos randomizados não são possíveis de serem realizados devido a várias limitações de se conduzir esse tipo de pesquisa em seres humanos, como por exemplo, a impossibilidade de se analisar microscopicamente as alterações teciduais após o procedimento de reimplante, que requer extrações e consequente rompimento das fibras do ligamento periodontal e a desvantagem numericamente representativa quando comparada à avaliação experimental em animais (Consolaro, 2007; Andreasen et al., 2010). Portanto, mais estudos clínicos experimentais e

observacionais prospectivos em humanos são necessários para fornecer uma base para futuras revisões sistemáticas e meta-análises.

De acordo com as diretrizes da IADT, o conhecimento do tempo extra-alveolar é de fundamental importância para classificar o tratamento como reimplante imediato ou tardio, e, assim, para determinar o prognóstico (Andersson et al., 2012). Em dentes reimplantados após um longo período de tempo extra-alveolar foi verificada a presença de anquilose e rápida reabsorção de raiz (Andreasen e Andreasen, 2007). Em quatro, dos seis estudos incluídos nesta revisão, o tempo extra-alveolar não estava claramente descrito.

Esta revisão sistemática identificou diversos meios de conservação utilizados para manutenção dos dentes avulsionados, incluindo água de coco, água da torneira, leite de soja, leite integral, solução salina, saliva, própolis, soro fisiológico, solução Euro-Collins, solução salina balanceada de Hank's (HBSS) e Viaspan®. No entanto, essa revisão não foi capaz de identificar qual o melhor meio de conservação capaz de prevenir a anquilose e a reabsorção por substituição e, conseqüentemente, a perda do dente. Nenhum dos estudos incluídos apresentou um nível de evidência elevado. Estudos com um "alto nível de evidência" indicam que há forte confiança de que o verdadeiro efeito esteja próximo daquele estimado. Apenas um estudo (Pettiette et al., 1997) foi classificado com um nível de evidência moderado, o que indica que há confiança moderada no efeito estimado, mas há uma possibilidade de modificar a confiança na estimativa do efeito a partir de trabalhos futuros.

Em conclusão, devido à heterogeneidade dos dados e às limitações dos estudos, a literatura atual não fornece evidência suficiente para determinar o melhor meio de conservação para se obter um reimplante bem sucedido do dente. São necessários mais estudos que avaliem os meios de conservação para os dentes avulsionados, especialmente devido ao risco de anquilose após o reimplante.

Capítulo 2. EFEITO DO TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE RADICULAR COM DENOSUMAB PREVIAMENTE AO REIMPLANTE DENTÁRIO TARDIO

CAPÍTULO 2. EFEITO DO TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE RADICULAR COM DENOSUMAB PREVIAMENTE AO REIMPLANTE DENTÁRIO TARDIO

A reabsorção radicular externa por substituição consiste na substituição do tecido dental radicular por tecido ósseo (Hammarstöm et al., 1986c; Tronstad, 1988), e sempre deve ser considerada patológica, quando acomete dentes permanentes (Consolaro, 2005). Diferentemente, o tecido ósseo está em constante remodelação óssea, que se caracteriza por uma reabsorção fisiológica (Consolaro, 2005). Entretanto, essa destruição do tecido dental mineralizado é proveniente da ação de clastos, células gigantes e multinucleadas (Ne, et al., 1999), as quais interagem com mediadores liberados por osteoblastos e macrófagos, em situações em que há perda do recobrimento da superfície radicular pelos cementoblastos, permitindo, então, que o dente participe do *turnover* ósseo (Hammarstöm et al., 1989). Ao conjunto formado pelos clastos, osteoblastos e macrófagos dá-se o nome de Unidade Osteorremodeladora (BMU), o qual é responsável pela reabsorção de tecido mineralizado (Rodan e Martin, 1981).

Há medicamentos que atuam controlando os mediadores da osteoclastogênese, que estão intimamente ligados à dinâmica de processos de reabsorção do osso e remodelação. Os mediadores são: osteoprotegerina (OPG) (Lacey et al., 1998), o receptor ativador do fator nuclear kappa-B (RANK) (Anderson et al., 1997) e seu ligante (RANKL) (Kartsogianinnis et al., 1999). O equilíbrio entre as expressões dos componentes do sistema RANK/RANKL/OPG fornece importantes informações sobre o metabolismo ósseo (Heymann et al., 2008). Em estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, observamos que, após reimplante de dentes de cães, nos grupos com menor tempo extra-alveolar (20 minutos) foi encontrada uma menor frequência de reabsorções dentárias inflamatória e de substituição em relação ao grupo com mais tempo extra-alveolar (90 minutos). Na área de reabsorção dentária inflamatória a síntese de RANKL aumentou e foi mais intensa conforme maior o tempo extra-alveolar ao passo que na área de reabsorção dentária por substituição houve inibição da síntese de periostina e aumento de fosfatase alcalina conforme maior o tempo extra-alveolar (90 minutos) (Longo et al., 2016). A Periostina é utilizada como marcador específico do ligamento periodontal (Horiuchi et al., 1999; Pi et al., 2007; Rios et al., 2014; Yamada et al., 2014).

O Denosumab, uma droga anti-reabsorção óssea, é um anticorpo (IgG2) monoclonal que tem como alvo o RANKL, ao qual se liga com elevada afinidade e especificidade, prevenindo a ativação do seu receptor, RANK, na superfície de precursores dos osteoclastos e nos osteoclastos (Scagliotti et al., 2012; Curioni-Fontecedro et al., 2013). A prevenção da interação entre RANKL/RANK inibe a formação, ativação, diferenciação e sobrevivência dos osteoclastos, reduzindo assim a reabsorção óssea no osso cortical e trabecular (Heymann et al., 2008). Produzido pela Amgen Inc. (EUA), a partir de técnicas de engenharia genética, o Denosumab é composto por 60 mg de Denosumab e 1 mL de excipientes (ácido acético glacial, hidróxido de sódio, sorbitol-E420 e água), e é fornecido como uma substância de uso único, estéril, sem adição de conservantes, incolor e pH 5,2 (Scagliotti et al., 2012; Curioni-Fontecedro et al., 2013). Ainda, é uma droga utilizada, também, para tratamento de lesões ósseas cancerosas associadas ao mieloma múltiplo e metástases ósseas (Curioni-Fontecedro et al., 2013). Além disso, o Denosumab demonstrou efeitos inibitórios sobre a reabsorção óssea observados em pacientes com osteoporose, artrite reumatóide e doença de Paget (Silva e Branco, 2012; Tanaka, 2013). Recentemente, o Denosumab tem sido proposto como possível medicamento capaz de oferecer resultados favoráveis no controle da destruição dos tecidos de suporte dos dentes, podendo assim, representar no futuro um papel importante na terapia periodontal (Gokhale e Padhye, 2013).

Assim, muitas pesquisas estão sendo realizadas no intuito de verificar esses efeitos inibitórios da reabsorção óssea do Denosumab (Bekker et al., 2004; Lewiecki 2008; Keizer et al., 2010; Mould e Green, 2010; Sutjandra et al., 2011; Lipton et al., 2012; Boyce et al., 2014; Augoulea et al., 2017; Qaseem et al., 2017; Tanaka et al., 2017). Devido à sua longa meia-vida no corpo, a administração subcutânea da droga a cada 6 meses é suficiente para obter efeito inibitório sobre a reabsorção óssea, sugerindo que este medicamento seja mais eficaz que os bisfosfonatos, os quais são atualmente utilizados como fármacos anti-reabsorção óssea (Henry et al., 2011; Scagliotti et al., 2012). Dessa forma, a utilização de um fármaco que permaneça retido por prolongados períodos de tempo próximo à superfície radicular seria interessante considerando que anquilose e reabsorção por substituição são eventos que ocorrem lentamente. Sabe-se que a anquilose atinge seu pico após duas semanas e que sua progressão diminui significativamente entre 4 e 8 semanas após o reimplante (Andreasen e Kristerson, 1981a). Ainda, o processo de reabsorção por substituição é lento nos adultos, de modo que o dente pode permanecer na boca entre 10 e 20 anos, sendo em

crianças o tempo médio de 2 a 6 anos (Andreasen et al., 1995). No entanto, esse medicamento ainda não foi avaliado, como medicação tópica, em modelo de reimplante dentário. Por interagir com o ligante específico do receptor de precursores osteoclásticos e osteoclastos, que ativa a diferenciação dessas células, acredita-se que esse medicamento seja capaz de inibir a osteoclastogênese, e apresentando-se assim como um potencial fármaco com efeitos inibitórios sobre a remodelação óssea, impedindo a ocorrência da reabsorção óssea por substituição.

Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar, *in vivo*, o efeito do medicamento Denosumab no controle da anquilose e da reabsorção por substituição, em superfícies radiculares de dentes de ratos reimplantados após 60 minutos mantidos em meio extra-alveolar seco.

METODOLOGIA

Inicialmente, o presente projeto de pesquisa foi submetido à apreciação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de São Paulo (USP) – Campus de Ribeirão Preto, tendo sido aprovado (Processo nº 2014.1.375.58.1) (Anexo).

Animais

Foram utilizados 36 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, de 6 a 8 semanas de idade, pesando em de 150 a 200 gramas, adquiridos do Biotério Central da Universidade de São Paulo – Campus de Ribeirão Preto. Todos os animais foram mantidos no Biotério I da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, alocados em gaiolas de polipropileno com tampas de aço inoxidável perfurado, de 15 x 20 cm (3 animais por gaiola), forradas com cama de maravalha autoclavada, em temperatura ($22 \pm 10\%$) e umidade relativa do ar ($55 \pm 10\%$) constantes, em um ciclo de claro-escuro de 12:12 horas, com dieta padrão de laboratório, previamente ao período experimental, e livre acesso à água. Durante o período experimental, a ração convencional moída (Labina – Purina) foi fornecida aos ratos submetidos ao reimplante dentário, a fim de evitar um trauma oclusal nesses dentes.

Procedimentos experimentais

Para a realização dos procedimentos operatórios, os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (Ketamina 10%, Agener União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP) na dosagem de 150mg/Kg de peso, e xilazina a 2% (Dopaser, Laboratórios Calier S/A, Barcelona, Espanha), na dosagem de 7,5mg/Kg de peso, via intramuscular. Em seguida, os animais foram devidamente posicionados em mesa cirúrgica específica para a realização de procedimentos odontológicos, permitindo a manutenção da abertura da boca, para acesso aos incisivos centrais superiores.

Foi realizada a antisepsia da porção anterior da maxila com solução de clorexidina a 2% (Manipularium Fórmulas Farmacêuticas, Ribeirão Preto-SP, Brasil). Em seguida, foi realizada a sindesmotomia, a luxação e a extração propriamente dita do incisivo superior direito, a fim de simular uma avulsão. Para os procedimentos cirúrgicos de sindesmotomia, luxação e extração foram utilizados instrumentos cirúrgicos especialmente adaptados (Figura 2.1).

Figura 2.1. Instrumentos cirúrgicos especialmente adaptados para a realização de procedimentos cirúrgicos em dentes de ratos. A seta indica a parte ativa confeccionada para a exodontia de incisivo de ratos.

Os dentes extraídos foram fixados pelas coroas em uma lâmina de cera rosa nº7 e mantidos em temperatura ambiente por um tempo pré-estabelecido de 60 minutos, simulando as condições em que os dentes avulsionados são reimplantados tardiamente, de acordo com os protocolos descritos previamente (Hellsing et al., 1993; Nishioka et al., 1998; Ricieri et al., 2009; Saito et al., 2011; Vilela et al., 2011).

Para o experimento, os animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos de estudo, como pode ser observado a seguir:

- *Grupo I (Controle positivo – Reimplante tardio sem tratamento; n= 12 dentes)*

Decorridos 60 minutos de tempo extra-alveolar em meio seco os dentes tiveram a papila dental excisionada com auxílio de uma lâmina de bisturi #15 (B-D Becton Dickinson Industrias Cirúrgicas Ltda, Juiz de Fora-MG, Brasil) e, em seguida, o tecido pulpar foi extirpado empregando-se uma lima Hedström #15 (25mm; Sybron Kerr Corporation, Orange, CA, EUA), ligeiramente pré-curvada. Em seguida, os canais radiculares foram irrigados com soro fisiológico a 0,9% esterilizado (JP Indústria Farmacêutica S.A., Ribeirão Preto-SP, Brasil) e aspirados com seringa tipo Luer Lock contendo uma cânula nº 25 x 6 acoplada (B-D Becton Dickinson Industrias Cirúrgicas Ltda, Juiz de Fora-MG, Brasil). Assim, os canais radiculares foram secos com pontas de papel absorventes esterilizadas e preenchidos com pasta à base de hidróxido de cálcio (CALEN[®]) (S.S. White Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro- RJ, Brasil) com o auxílio de uma seringa ML (S.S. White Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro- RJ, Brasil). A seguir, os alvéolos foram irrigados com solução salina e os dentes foram reimplantados nos seus respectivos alvéolos, simulando o reimplante tardio (Ricieri et al., 2009; Saito et al., 2011; Vilela et al., 2012).

- *Grupo II e III (Experimental – Reimplante tardio após tratamento da superfície com Denosumab; n= 24)*

Decorridos 60 minutos de tempo extra-alveolar em meio seco os dentes tiveram a papila dental excisionada e o tecido pulpar extirpado, como descrito no grupo I. Em seguida, cada dente foi imerso em solução de Denosumab a 60mg/mL e 30mg/mL para os grupos II (n= 12) e III (n= 12), respectivamente, por 10 minutos. Os canais radiculares foram irrigados, aspirados, secos e preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio, como descrito no grupo I.

A seguir, os alvéolos foram irrigados com solução salina e os dentes foram reimplantados.

Na tabela 2.1 está resumida a distribuição dos animais nos diferentes grupos de estudo.

Tabela 2.1. Distribuição dos grupos, número de animais e períodos experimentais

Grupos	Procedimento	Períodos experimentais e número de animais
I	Reimplante Tardio e sem tratamento de superfície (controle positivo)	15 (n= 6) e 60 dias (n= 6)
II	Reimplante Tardio e com tratamento de superfície – 60mg/mL de Denosumab (grupo experimental)	15 (n= 6) e 60 dias (n= 6)
III	Reimplante Tardio e com tratamento de superfície – 30 mg/mL de Denosumab (grupo experimental)	15 (n= 6) e 60 dias (n= 6)

Após o reimplante, não foi realizada nenhuma contenção dos dentes e os animais receberam uma dose única de antibiótico 20 000 U.I. de penicilina G benzatina (Eurofarma Laboratórios Ltda, São Paulo-SP, Brasil), por via intramuscular, na parte posterior da coxa traseira direita. Ainda, os animais receberam ração sólida triturada após o experimento.

Eutanásia dos animais

A eutanásia dos animais foi realizada após 15 e 60 dias, decorridos do reimplante dentário. Os animais foram anestesiados com Ketamina a 10% (75 mg/Kg) e Xilazina a 2% (10 mg/Kg) por via intramuscular, e em seguida, mortos por decaptação em guilhotina.

Processamento histotécnico e avaliação microscópica

As peças anatômicas contendo as maxilas e os dentes reimplantados (n=6 dentes por grupo, por período) foram removidas com tesoura cirúrgica esterilizada, fixadas por imersão em formol tamponado a 10% por 24 horas à temperatura ambiente e, em seguida, lavadas por, aproximadamente, 4 horas em água corrente. Para desmineralização das peças, foi utilizada solução à base de EDTA a 4,13% (pH 7,4) (Warshawsky & Moore, 1967). As peças foram mantidas nesta solução, à temperatura ambiente, trocada a cada 3 dias, até sua completa descalcificação, que ocorreu, aproximadamente, após 30 dias. O grau de descalcificação das estruturas mineralizadas foi testado por meio da penetração de uma agulha nos tecidos, para verificação da sua consistência. Após a descalcificação, as peças foram submetidas ao processamento histotécnico de rotina, sendo lavadas em água corrente por 2 horas, desidratadas em concentrações crescentes de álcool (70% e 95% por 60 minutos cada; 2 trocas de 100% por 60 minutos cada; e 1 troca de álcool 100% overnight - Álcool Etílico Absoluto Anidro®; J.T. Baker) e diafanizadas em xilol (3 trocas de 40 minutos -

Xylol[®]; Merck). Em seguida, as peças foram incluídas em parafina (Histosec[®] Pastillen; Merck), para confecção dos blocos. Os blocos contendo os dentes foram armazenados em congelador e, em seguida, foram cortados transversalmente, em relação ao longo eixo do incisivo, em micrótomo (Leica RM2145; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha). Previamente ao início da obtenção dos cortes semi-seriados, foi feito um estudo piloto para definir a localização do terço médio e dessa forma, para padronizar a obtenção dos cortes do terço médio do incisivo direito. Para tanto, uma amostra foi cortada em toda a sua extensão, ou seja, do porção apical até a coroa, no sentido transversal e sem descarte. Um total de aproximadamente 1.400 cortes foi obtido, sendo que cada terço (apical, médio e cervical) continha aproximadamente 460 cortes. O início do terço apical foi padronizado quando da visualização da bainha epitelial de Hertwig. Dessa forma, após visualizar a bainha epitelial de Hertwig foram descartados aproximadamente 500 µm até atingir o terço médio. Assim, 30 cortes semi-seriados com espessura de 5 µm foram obtidos. Em seguida, 10 cortes com espessura de 20 µm foram descartados. Por fim, foram obtidos mais 30 cortes semi-seriados com espessura de 5 µm. As lâminas obtidas foram coradas pela hematoxilina e eosina (HE) para avaliação histopatológica e histométrica.

Inicialmente, os cortes de cada grupo experimental foram corados com hematoxilina e eosina (HE), e foram submetidos à análise em microscopia de luz convencional, para descrição da dentina, do cemento, do ligamento periodontal e do osso alveolar. Paralelamente, foi realizada a análise morfométrica do comprimento (perímetro) da anquiose, da reabsorção por substituição e das áreas de reabsorção dentária. Ainda, foi realizada a análise morfométrica da área do ligamento periodontal em microscopia de fluorescência. Os espécimes sequenciais foram avaliados por Brown & Brenn, para identificar a presença e localização de micro-organismos; e imunohistoquímica para a identificação de marcadores da osteoclastogênese (RANKL e OPG) e de um marcador para células do ligamento periodontal (Periostina). Todas as análises foram realizadas no microscópio Axio Imager.M1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha), com câmera AxioCam MRc5 acoplada (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha). As análises foram realizadas nos cortes do terço médio da raiz. O terço médio foi escolhido para avaliação, uma vez que o terço cervical e apical são, geralmente, danificados pela ação da pinça durante a extração dentária e da lâmina de bisturi quando da extração da papila, de acordo com Sottovia et al. (2006). Todas as análises foram realizadas por um único avaliador calibrado, em conhecimento prévio do grupo que estava sendo analisado.

Análise microscópica descritiva das características da dentina, do cimento, do ligamento periodontal e do osso alveolar, da ocorrência de reabsorção inflamatória, anquilose e reabsorção por substituição.

A análise descritiva das características da dentina, do cimento, do ligamento periodontal, do osso alveolar e, ainda da ocorrência de reabsorção inflamatória, anquilose e reabsorção de substituição foi realizada nos cortes representativos de cada período e de cada grupo, de acordo com os seguintes parâmetros (Sottovia et al., 2010):

- Dentina: características da superfície (regular ou irregular).
- Cimento: características da superfície (regular ou irregular).
- Ligamento periodontal: extensão (normal ou aumentado); característica do infiltrado celular inflamatório, presença de edema e de fibras colágenas.
- Osso alveolar: ausência/presença de reabsorção, osteoblastos e osteoclastos.
- Anquilose: ausente ou presente.
- Reabsorção externa de substituição: ausente ou presente.
- Reabsorção externa inflamatória: ausente ou presente.
- Reabsorção externa de superfície: ausente ou presente.

Análise de frequência da anquilose, reabsorção por substituição e reabsorção dentária

Para a análise de frequência da ocorrência de anquilose e de reabsorção por substituição, foram atribuídos escores de 0 a 1, como descrito a seguir:

- Escore 0: Ausência;
- Escore 1: Presença.

A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste não-paramétrico exato de Fisher ($\alpha=5\%$).

Para a análise de frequência da ocorrência de reabsorção dentária, foram atribuídos escores de 0 a 3, como descrito a seguir:

- Escore 0: Ausência de reabsorção;
- Escore 1: Reabsorção restrita ao cimento;
- Escore 2: Reabsorção de cimento e de dentina;
- Escore 3: Reabsorção atinge o espaço pulpar.

Os resultados obtidos para esta avaliação foram expressos em porcentagem. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste não-paramétrico de qui-quadrado ($\alpha=5\%$).

Análise morfométrica

A análise morfométrica do comprimento de anquilose e/ou de reabsorção por substituição foi realizada nos espécimes corados com HE, utilizando o microscópio Axio Imager.M1, em aumento de 4x, conforme descrito por Panzarini et al. (2014a). Para cada espécime, o comprimento da anquilose e da reabsorção por substituição, avaliados em todo perímetro do dente, foi delineado e mensurado em mm, empregando o *software* Axio Vision Rel 4.8. A delimitação da anquilose foi feita nas regiões em que houve fusão do tecido ósseo e tecido dental ao passo que a delimitação da reabsorção por substituição se deu nas regiões em que o dente foi substituído por tecido ósseo. Tendo em vista que muitas vezes esses processos se sobrepõem, a comparação entre os grupos foi realizada considerando a somatória da anquilose com a reabsorção externa de substituição. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste ANOVA e pós-teste de Tukey ($\alpha=5\%$).

A análise morfométrica das áreas de reabsorção dentária foi realizada nos espécimes corados com HE, utilizando o microscópio Axio Imager.M1, em aumento de 4x, conforme descrito por Panzarini et al. (2014a). Para cada espécime, a área do dente foi delineada e mensurada em mm², empregando o *software* Axio Vision Rel 4.8. A delimitação da reabsorção dentária foi feita excluindo a cavidade pulpar (Figura 2.2A). Essa mensuração foi realizada também no dente adjacente (incisivo central superior) hígido, não submetido à avulsão e reimplante, sendo essa medida considerada a área do dente. Os valores foram convertidos em porcentagem e da área do dente hígido (100%) foi subtraída a área do dente reimplantado, para obtenção da porcentagem de tecido reabsorvido. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste ANOVA e pós-teste de Tukey ($\alpha=5\%$).

A análise morfométrica da área do ligamento periodontal foi realizada nos espécimes corados com HE, utilizando o microscópio Axio Imager.M1, em aumento de 1,25x, operando no modo fluorescente. Foi utilizado filtro Alexa Fluor (AF448) com as seguintes características: excitação de G365, refletores FT395 e emissão LP420. Para cada espécime, as áreas do ligamento periodontal, foram delineadas e mensuradas em mm², empregando o *software* Axio Vision Rel 4.8 (Figura 2.2B). A delimitação do ligamento periodontal excluiu o

tecido ósseo e o tecido dental, facilmente identificado pela forte fluorescência verde e incluiu área do ligamento periodontal, identificado pela ausência de fluorescência e aparência escurecida (Figura 2.2B). Essa mensuração foi realizada também no dente adjacente (incisivo central superior) hígido, não submetido à avulsão e reimplante, sendo essa medida considerada a área do ligamento periodontal. Os valores foram convertidos em porcentagem e da área do ligamento periodontal do dente hígido (100%) foi subtraída a área do ligamento periodontal do dente reimplantado, para obtenção da porcentagem de reabsorção de tecido ósseo alveolar. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste ANOVA e pós-teste de Tukey ($\alpha = 5\%$).

Figura 2.2. Fotomicrografias dos cortes microscópicos representativos da análise morfométrica, obtidos com o emprego do programa *software* Axio Vision Rel 4.8, corados com hematoxilina e eosina. (A) Delimitação da superfície externa e interna do dente (linha preta) e do comprimento das áreas de anquilose e reabsorção por substituição (linha verde). (4X) (B) Delimitação da área externa do dente e do tecido ósseo (linha vermelha), do lado direito e esquerdo da maxila simultaneamente, simulando o dente reimplantado e o dente hígido. (1,25X)

Análise histomicrobiológica

Os cortes foram corados pelo método de Brown & Brenn modificado para evidênciação de micro-organismos (Engbaek *et al.*, 1979). Inicialmente foram desparafinizados (3 banhos de xilol de 8 minutos cada), hidratados (banhos com álcoois a 100%, 95% e 80%), lavados em água corrente por, aproximadamente, 3 minutos, e colocados em um recipiente com água destilada. A solução de cristal violeta a 1% (Ecibra, Cetus Ind. Com. Prod. Quim. Ltda., São Paulo, SP) tamponada com bicarbonato de sódio a 5% (Merck S.A. Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, RJ) foi aplicada sobre os cortes por 30 segundos e, em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada. A seguir, as lâminas foram imersas em solução de iodo por 1 minuto, lavadas em água destilada e imersas em solução de éter-acetona (1 : 1). Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e imersas em fucsina básica a 0,25 mg / mL (1 minuto) e posteriormente em ácido pícrico aquoso (2:4:4 Trinitrophenol, $C_6H_2(OH)(NO_2)_3$ - May & Baker Ltda., Inglaterra), por 1 minuto. A seguir foram imersas em acetona p.a. (CH_3COCH_3 , Ecibra) por 15 segundos, seguida por imersão rápida em acetona-xilol (1 : 1) e montadas em Permount® (Fisher Scientific, Fair Lawn, EUA).

Os micro-organismos foram observados em microscopia de luz convencional, com imersão à óleo, efetuando-se a diferenciação entre Gram-negativos e Gram-positivos. Com esta coloração, os micro-organismos Gram-positivos são corados em azul e os micro-organismos Gram-negativos em vermelho. Essa coloração foi utilizada para avaliar a presença ou ausência de micro-organismos e sua localização na superfície radicular ou no tecido ósseo. Para esta avaliação foram atribuídos escores 0 a 2, como descrito a seguir:

- Escore 0: ausência de micro-organismos;
- Escore 1: presença de micro-organismos na superfície radicular;
- Escore 2: presença de micro-organismos no tecido ósseo.

Os dados foram apresentados descritivamente como porcentagem de espécimes contendo micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos nas diferentes regiões. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste não-paramétrico exato de Fisher ($\alpha=5\%$).

Imunohistoquímica

As reações foram realizadas utilizando o método do complexo avidina-biotina-peroxidase (método indireto). Os cortes histológicos foram desparafinizados, hidratados em

série decrescente de álcoois. A recuperação antigênica foi realizada utilizando tampão de citrato (pH 6,0) no forno de micro-ondas com disparos de 12 segundos e intervalos de 2 minutos entre cada disparo. Após o retorno à temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com tampão fosfato salina (PBS) e 1 vez com solução PBS/Triton (Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, EUA) a 0,5%, também por 5 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio a 3 % por 40 minutos, sob a proteção da luz. A seguir, as lâminas foram novamente lavadas com PBS e PBS/Triton conforme descrito anteriormente. O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado com solução de BSA a 3% (albumina de soro bovino) por 60 minutos. A seguir, as lâminas foram incubadas, *overnight* a 4°C, com os anticorpos primários diluídos em BSA a 3%: RANKL (sc-7628, Santa Cruz Biotechnology Inc.; diluído 1:100) e OPG (sc-8468, Santa Cruz Biotechnology Inc.; diluído 1:100), que são indicadores de remodelação óssea. Ainda, foram realizadas imunomarcações para Periostina (PRT) (sc-67233, Santa Cruz Biotechnology Inc.; diluído 1:50), um marcador de células do ligamento periodontal. Após retornarem à temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário biotilado (rabbit anti-goat IgG sc-2774 e goat anti-rabbit IgG sc-2040), dependendo da espécie na qual o anticorpo primário foi produzido (Vector Laboratories Inc., Burlingame, EUA; diluídos 1:200), por 1 hora. Após nova lavagem, foi colocado o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC kit, Vecstain; Vector Laboratories Inc.) sobre os cortes por 30 minutos. A seguir, as lâminas foram novamente lavadas com PBS e PBS/Triton e foi efetuada a revelação da reação com solução de diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, EUA) e H₂O₂ a 3% em PBS, por 1 minuto. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris por 30 segundos, lavadas em água corrente, lavadas em água amoniacal por 30 segundos, lavadas em água corrente, diafanizadas, desidratadas e montadas em Entelan®. Lâminas-controle foram utilizadas para testar a especificidade da imunomarcação nas quais foi omitido o anticorpo primário e incubadas com tampão fosfato salina (PBS). A identificação de marcadores da osteoclastogênese (RANKL e OPG) e de Periostina foi realizada em microscópio Axio Imager.M1 sob luz convencional. Os resultados foram expressos de maneira qualitativa, levando-se em consideração a presença/ausência e a localização das marcações.

RESULTADOS

Análise microscópica descritiva das características da dentina, do cimento, do ligamento periodontal e do osso alveolar, da ocorrência de reabsorção inflamatória, anquilose e reabsorção por substituição.

Grupo I – Reimplante tardio sem tratamento - 15 dias

O cimento radicular e a dentina apresentavam-se com poucas e pequenas irregularidades na sua superfície. O ligamento periodontal estava moderadamente aumentado. Em 50% dos espécimes, o tecido conjuntivo presente no espaço referente ao ligamento periodontal estava totalmente desorganizado com poucos fibroblastos, poucas fibras colágenas e áreas de degeneração. Havia presença de células inflamatórias, espalhadas por todo ligamento periodontal. O osso alveolar encontrava-se com presença de áreas de reabsorção ativa (Figura 2.3 – A e B). Neste grupo, não foi verificada a presença de anquilose e reabsorção por substituição. No entanto, cerca de 16% dos dentes sofreram reabsorção completa da raiz (Tabela 2.2).

Grupo I – Reimplante tardio sem tratamento - 60 dias

O cimento e a dentina apresentavam-se acometidos por reabsorções na maior parte da superfície dentária dos espécimes estudados. O ligamento periodontal estava moderadamente aumentado, com presença de infiltrado inflamatório denso e difuso, predominantemente polimorfonuclear, por toda região. O osso alveolar encontrava-se com presença de áreas de reabsorção ativa. Reabsorções externa inflamatória e por substituição foram observadas na maioria dos animais, sendo estas profundas, comunicando a área do ligamento periodontal a câmara pulpar, em algumas regiões (Figura 2.4 – A e B).

Grupo II – Reimplante tardio + Denosumab 60 mg/mL – 15 dias

A dentina não foi acometida por reabsorções, nesse grupo. O cimento radicular estava irregular, devido às áreas de reabsorção. O ligamento periodontal apresentava-se levemente aumentado e reparado. Havia presença de áreas de anquilose em todos os animais. Alguns pontos de reabsorção por substituição e de reabsorção externa de superfície foram observados. Reabsorção do tipo inflamatória completa da raiz não foi verificada nesse

grupo. Observou-se uma reabsorção inflamatória leve. O osso alveolar encontrava-se com aspecto de normalidade e com osteoblastos na sua superfície (Figura 2.3 – C e D).

Grupo II – Reimplante tardio + Denosumab 60 mg/mL – 60 dias

A dentina apresentou integridade, na maioria dos espécimes, nesse grupo. O cimento radicular estava irregular, devido às áreas de reabsorção. O ligamento periodontal apresentava-se levemente aumentado. Alguns pontos de anquilose e de reabsorção externa de superfície foram observados, em poucos animais. Reabsorção do tipo inflamatória completa da raiz não foi verificada nesse grupo. O osso alveolar encontrava-se normal e com osteoblastos na sua superfície (Figura 2.4 – C e D).

Grupo III – Reimplante tardio + Denosumab 30 mg/mL – 15 dias

A dentina e o cimento radicular apresentavam-se irregulares. O ligamento periodontal apresentava-se levemente aumentado. Em 50% dos espécimes, havia áreas de anquilose e de reabsorção por substituição. Reabsorção do tipo inflamatória completa da raiz não foi verificada nesses espécimes. O osso alveolar encontrava-se com aspectos de normalidade e com osteoblastos na sua superfície (Figura 2.3 – E e F).

Grupo III – Reimplante tardio + Denosumab 30 mg/mL – 60 dias

O cimento e a dentina apresentavam-se acometidos por reabsorções. O ligamento periodontal estava levemente aumentado. Todos os espécimes apresentaram pontos de anquilose e de reabsorção por substituição. Reabsorção do tipo inflamatória completa da raiz não foi verificada nesses espécimes. O osso alveolar encontrava-se com aspecto normal e com osteoblastos na sua superfície (Figura 2.4 – E e F).

Resumidamente, a análise microscópica descritiva do grupo Denosumab revelou um infiltrado inflamatório moderado, um ligamento periodontal reparado, e tecido ósseo com aspectos de normalidade. Após 15 dias do reimplante, os grupos Reimplante tardio + Denosumab 60 mg/mL e Reimplante tardio + Denosumab 30 mg/mL não preveniram a anquilose e a reabsorção por substituição, comparado com o grupo sem tratamento de superfície. O reimplante tardio sem tratamento mostrou um infiltrado inflamatório intenso e um ligamento periodontal aumentado. Por outro lado, após 60 dias, o grupo Reimplante

tardio + Denosumab 60 mg/mL preveniu a anquilose e a reabsorção por substituição, comparado com o grupo controle, diferentemente do Denosumab 30 mg/mL que não apresentou nenhum efeito.

Tabela 2.2. Frequência de anquilose, reabsorção por substituição e reabsorção inflamatória.

Grupos	Anquilose (%)	Reabsorção Externa por Substituição (%)	Reabsorção Externa por Substituição completa (%)	Reabsorção Externa Inflamatória (%)	Reabsorção Externa Inflamatória completa (%)
15 dias					
G1 (Reimplante tardio)	0	0	0	33	16
G2 (Reimplante tardio + Denosumab 60 mg/mL)	100	40	0	0	0
G3 (Reimplante tardio + Denosumab 30 mg/mL)	50	50	33	16	0
60 dias					
G1(Reimplante tardio)	66	66	0	66	33
G2 (Reimplante tardio + Denosumab 60 mg/mL)	20	20	20	20	0
G3 (Reimplante tardio + Denosumab 30 mg/mL)	100	100	50	0	0

Figura 2.3. Fotomicrografias representativas dos eventos microscópicos observados durante análise descritiva da superfície dentária e do ligamento periodontal, após reimplante dental nos grupos tardio, reimplante tardio + Denosumab 60 mg/mL e reimplante tardio + Denosumab 30 mg/mL, no período experimental de 15 dias, em microscopia de luz convencional. **(A)** Superfície dental e ligamento periodontal. Osso alveolar (o); ligamento periodontal (lp) moderadamente aumentado. (Controle Tardio – 15 dias; 4X). **(B)** Detalhe da imagem A (quadrado), onde se observa a superfície do cimento (c) e da dentina (d) com áreas de reabsorção (seta). (Controle Tardio – 15 dias; 20X). **(C)** Superfície dental e ligamento periodontal. Osso alveolar (o); ligamento periodontal (lp) levemente aumentado. (reimplante tardio + Denosumab 60 mg/mL – 15 dias; 4X). **(D)** Detalhe da imagem C (quadrado), onde se observa áreas de anquilose (seta). (reimplante tardio + Denosumab 60 mg/mL – 15 dias; 20X). **(E)** Superfície dental e ligamento periodontal. Osso alveolar (o); ligamento periodontal (lp) levemente aumentado. (Reimplante tardio + Denosumab 30 mg/mL – 15 dias; 4X). **(F)** Detalhe da imagem E (quadrado), onde se observa áreas de reabsorção por substituição (seta). (Reimplante tardio + Denosumab 30 mg/mL – 15 dias; 20X).

Figura 2.4. Fotomicrografias representativas dos eventos microscópicos observados durante análise descritiva da superfície dentária e do ligamento periodontal, após reimplante dental nos grupos controle tardio, tardio + Denosumab 60 mg/mL e tardio + Denosumab 30 mg/mL, no período experimental de 60 dias, em microscopia de luz convencional. **(A)** Superfície dental e região periodontal. Osso alveolar (o); ligamento periodontal (lp) moderadamente aumentado. (Reimplante Tardio – 60 dias; 4X). **(B)** Detalhe da imagem A (quadrado), onde se observa a superfície do cimento (c) e da dentina (d) com áreas de reabsorção com presença de infiltrado inflamatório denso, predominantemente polimorfonuclear (seta). (Reimplante Tardio – 60 dias; 20X). **(C)** Superfície dental e ligamento periodontal. Osso alveolar (o); ligamento periodontal (lp) levemente aumentado. (Reimplante tardio + Denosumab 60 mg/mL – 60 dias; 4X). **(D)** Detalhe da imagem C (quadrado), onde se observa a superfície do cimento (c) e da dentina (d), com áreas de anquilose (seta). (Reimplante tardio + Denosumab 60 mg/mL – 60 dias; 40X). **(E)** Superfície dental e ligamento periodontal. Osso alveolar (o). (Reimplante tardio + Denosumab 30 mg/mL – 60 dias; 4X). **(F)** Detalhe da imagem E (quadrado), onde se observa uma formação óssea madura e presença de osteócitos (seta). (Reimplante tardio + Denosumab 30 mg/mL – 60 dias; 20X).

Classificação da reabsorção dentária

A Figura 2.5 representa os dados obtidos em ambos os períodos experimentais, com relação à reabsorção da superfície dentária, nos grupos Reimplante Tardio, Reimplante tardio + Denosumab 60 mg/mL e Reimplante tardio + Denosumab 30 mg/mL.

Em relação à frequência de reabsorção dentária, após 15 dias, observou-se diferença estatisticamente significativa entre os todos os grupos ($p < 0,0001$), de modo que no grupo Reimplante tardio + Denosumab 60 mg/mL as reabsorções foram mais superficiais, comparadas ao grupo controle (Figura 2.5A). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quando se avaliou a extensão da área reabsorvida ($p = 0,31$) (Figura 2.5B).

Em relação à frequência de reabsorção dentária, após 60 dias, observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos Reimplante Tardio e Reimplante tardio + Denosumab 60 mg/mL ($p < 0,001$) e Reimplante tardio + Denosumab 60 mg/mL e Reimplante tardio + Denosumab 30 mg/mL ($p < 0,0001$). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos Reimplante tardio e Reimplante tardio + Denosumab 30 mg/mL ($p = 0,1867$). Dessa forma, foi observado que no grupo Denosumab 60 mg/mL as reabsorções foram mais superficiais quando comparado ao grupo controle (Figura 2.5C). Em relação à extensão das áreas reabsorvidas, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,46$) (Figura 2.5D).

Figura 2.5. Representação gráfica da comparação dos resultados obtidos após a classificação das reabsorções dentárias, entre os grupos controle reimplante tardio, reimplante tardio + Denosumab 60 mg/mL e reimplante tardio + Denosumab 30 mg/mL, nos períodos de 15 e 60 dias.

Anquilose e Reabsorção externa por substituição

Em relação ao comprimento das áreas com anquilose e reabsorção externa por substituição, após 15 e 60 dias, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 2.6).

No entanto, em relação à frequência de anquilose, após 15 e 60 dias, observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos Reimplante tardio + Denosumab 60 mg/mL e Reimplante tardio + Denosumab 30 mg/mL, em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$). Os grupos Reimplante tardio + Denosumab 60 mg/mL e Reimplante tardio + Denosumab 30 mg/mL apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si ($p <$

0,0001). Ainda, no grupo Reimplante tardio + Denosumab 60 mg/mL, a anquilose apresentou-se transitória, de modo a apresentar uma redução de aproximadamente 75% aos 60 dias, quando comparado aos 15 dias (Tabela 2.2).

Em relação à frequência de reabsorção por substituição, após 15 dias e 60 dias, observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos Reimplante tardio + Denosumab 60 mg/mL e Reimplante tardio + Denosumab 30 mg/mL, em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$). Os grupos Reimplante tardio + Denosumab 60 mg/mL e Reimplante tardio + Denosumab 30 mg/mL apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si, após 60 dias ($p < 0,0001$), sem diferença estatisticamente significativa aos 15 dias ($p = 0,2007$) (Tabela 2.2).

Destarte, foi observado que a frequência de anquilose e reabsorção por substituição foi estatisticamente significativa menor no grupo Reimplante + Denosumab 60 mg/mL, após 60 dias, quando comparado ao controle ($p < 0,0001$). Por outro lado, foi observado que a frequência de anquilose e reabsorção por substituição foi estatisticamente significativa maior no grupo Reimplante tardio + Denosumab 30 mg/mL, após 60 dias, quando comparado ao grupo controle ($p < 0,0001$) (Tabela 2.2).

Figura 2.6. Representação gráfica da comparação dos resultados, após a obtenção dos perímetros das áreas de anquilose e reabsorção por substituição, entre os grupos reimplante tardio, reimplante tardio + Denosumab 60 mg/mL e reimplante tardio + Denosumab 30 mg/mL, nos períodos de 15 e 60 dias.

Área do ligamento periodontal

Em relação à área do ligamento periodontal, após 15 e 60 dias, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 2.7). No entanto, o grupo sem tratamento de superfície apresentou uma tendência numérica de se manter levemente aumentado em relação ao dente hígido, em relação aos grupos que foram submetidos ao tratamento de superfície, após 15 e 60 dias.

Figura 2.7. Representação gráfica da comparação dos resultados, após a obtenção da área do ligamento periodontal, entre os grupos reimplante tardio, reimplante tardio + Denosumab 60 mg/mL e reimplante tardio + Denosumab 30 mg/mL, nos períodos de 15 e 60 dias.

Contaminação microbiana dos espécimes

Com o objetivo de identificar e investigar a distribuição dos micro-organismos na superfície radicular e na superfície óssea dos dentes, após o reimplante, as lâminas foram coradas pelo Método de Brown & Brenn modificado.

Observou-se presença de grande quantidade de micro-organismos Gram-positivos nas superfícies radicular e óssea nos grupo Reimplante Tardio, em ambos períodos experimentais. No grupo Reimplante tardio + Denosumab 60 mg/mL observou-se uma menor quantidade de micro-organismos nas superfícies radicular e óssea, em relação ao

grupo controle, após 15 e 60 dias. No grupo Reimplante tardio + Denosumab 30 mg/mL, após 15 e 60 dias, os micro-organismos estavam praticamente ausentes na superfície óssea, em comparação ao grupo controle (Figura 2.8).

Figura 2.8. Fotomicrografias representativas dos cortes microscópicos dos animais, em ambos períodos experimentais, corados por meio da técnica de Brown & Brenn Modificada, evidenciando a ausência ou a presença e a localização microbiana na superfície radicular e na superfície óssea. Grupo 1 – reimplante tardio (A e B), evidenciando a intensa presença de micro-organismos na superfície óssea e na superfície radicular; Grupo 2 - reimplante tardio + Denosumab 60 mg/mL (C e D), demonstrando a presença de micro-organismos localizados na superfície óssea e na superfície radicular e Grupo 3 - reimplante tardio + Denosumab 30 mg/mL (E e F), onde não se observa a presença de micro-organismos na superfície óssea. (20 e 40X)

Grupo I

Grupo II

Grupo III

15 días

60 días

Após 15 e 60 dias, foi observada uma redução estatisticamente significativa da porcentagem de contaminação da superfície radicular e óssea, entre os grupo Reimplante tardio + Denosumab 60 mg/mL e Reimplante tardio + Denosumab 30 mg/mL, em relação ao grupo controle tardio ($p < 0.001$). Ainda, os grupos Reimplante tardio + Denosumab 60 mg/mL e Reimplante tardio + Denosumab 30 mg/mL apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si, após 15 e 60 dias ($p < 0,0001$) (Figura 2.9).

Nos espécimes avaliados, a microbiota que colonizou a superfície radicular e óssea era composta por micro-organismos Gram-positivos. Não foram identificados micro-organismos Gram-negativos em nenhum espécime.

Figura 2.9. Representação gráfica da comparação de resultados da presença de micro-organismos Gram-positivos nas superfícies radicular e óssea, após 15 e 60 dias do reimplante dentário, entre os grupos reimplante tardio, reimplante tardio + Denosumab 60 mg/mL e reimplante tardio + Denosumab 30 mg/mL. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle Tardio; # $p < 0,05$ comparando as diferentes concentrações de Denosumab.

Imunomarcação (Imunohistoquímica)

Marcações positivas para RANKL foram observadas nos espécimes do grupo controle Reimplante Tardio, aos 15 e aos 60 dias, localizadas ao redor do dente e também nos osteoblastos e no alvéolo. No entanto, nos grupos Reimplante tardio + Denosumab 60 mg/mL e Reimplante tardio + Denosumab 30 mg/mL, em ambos os períodos experimentais, não foram observadas marcações. Com relação à OPG, não foram observadas marcações nos espécimes nos grupos Reimplante Tardio, Reimplante tardio + Denosumab 60 mg/mL e Reimplante tardio + Denosumab 30 mg/mL, em ambos os períodos experimentais. O tratamento com Denosumab nas duas concentrações utilizadas inibiu a produção de RANKL sem modificar OPG.

As marcações para Periostina foram observadas no ligamento periodontal dos espécimes do grupo controle Reimplante Tardio bem como nos grupos Reimplante tardio + Denosumab 60 mg/mL e Reimplante tardio + Denosumab 30 mg/mL. Essa marcação estava ausente nas áreas de anquilose, em ambos os períodos experimentais. Esses resultados indicam que durante o processo de anquilose a síntese de periostina é inibida, o que resulta na fusão do osso à superfície radicular.

As imagens representativas das marcações para RANKL, OPG e Periostina estão apresentadas na Figura 2.10, evidenciando suas localizações.

Figura 2.10. Fotomicrografias de cortes microscópicos representativos dos animais, em ambos períodos experimentais, corados por meio da técnica de imunohistoquímica, evidenciando a ausência ou a presença e a localização dos marcadores RANKL, OPG e Periostina. Grupo 1 – reimplante tardio (A, B e C), Grupo 2 - reimplante tardio + Denosumab 60 mg/mL (D, E, e F) e Grupo 3 - reimplante tardio + Denosumab 30 mg/mL (G, H e I). (10 e 20X)

DISCUSSÃO

Os resultados desse estudo demonstraram que o tratamento de superfície com Denosumab preveniu a anquilose e a reabsorção por substituição, comparado com o grupo controle. Paralelamente, nossos resultados demonstraram que o Denosumab 30 mg/mL, diferentemente do grupo Denosumab 60 mg/mL, não preveniu a anquilose e a reabsorção por substituição, comparado com o grupo sem tratamento de superfície. No grupo Denosumab 60 mg/mL, a anquilose apresentou-se transitória, de modo a apresentar uma redução de aproximadamente 75% aos 60 dias, quando comparado aos 15 dias. Esses resultados encontrados no presente estudo estão de acordo com outros estudos clássicos, que relataram uma anquilose temporária ou transitória, com desaparecimento dentro de um período de 8 semanas, deixando a superfície radicular com reabsorções superficiais (Andreasen, 1975; Andreasen e Kristersson, 1981*b*). O fato de o grupo Denosumab 30 mg/mL não apresentar resultados favoráveis em relação à prevenção das principais sequelas do reimplante tardio, como a anquilose, pode ser atribuído à diluição dessa substância, testada na terapia de tratamento de superfície, ser incapaz de exercer seus efeitos tal qual a substância advinda na sua concentração inicial.

Outros fatores podem estar relacionados com a ocorrência de anquilose, além do longo tempo extra-alveolar e do meio de conservação inadequado para manutenção dos dentes avulsionados (Andreasen e Kristerson, 1981*b*; Ashkenazi et al., 1999; Andreasen et al., 2012). Dentre eles podemos destacar a medicação utilizada no tratamento endodôntico (Andreasen e Kristerson, 1981*a*; Hammarström et al., 1986*b*; Trope et al., 1992; Dunsha et al., 1995; Flores et al., 2001; Andreasen et al., 2007), a presença do ligamento periodontal necrótico na superfície radicular (Lindskog et al., 1985; Andreasen et al., 1995; Panzarini et al., 2003; Andreasen et al., 2007) e o uso de contenção rígida (Andreasen et al., 2007).

Em uma revisão de literatura e em outros estudos que avaliaram os materiais usados para preenchimento de canal radicular em dentes reimplantados, foi verificado que o hidróxido de cálcio é usualmente recomendado como medicação intra-canal temporária de dentes avulsionados (Trope, 2002; Negri et al., 2008; Panzarini et al., 2012*b*; Andersson et al., 2012). Assim, a pasta à base de hidróxido de cálcio foi utilizada, no presente estudo, como medicação intra-canal em todos os grupos, por simularem um reimplante tardio, tendo em vista que a medicação poderia ser somente introduzida no canal radicular de maneira retrógrada. No entanto, em um estudo mais recente que avaliou o processo de

reparo, após reimplante tardio em dentes de macaco obturados com hidróxido de cálcio e MTA, foi demonstrada uma maior ocorrência de anquilose nos dentes obturados com hidróxido de cálcio (Panzarini et al., 2014b).

Existem vários estudos que demonstraram que o ligamento periodontal de um dente avulsionado torna-se necrótico, após mais de 60 minutos, independente do meio em que o dente foi armazenado, resultando em anquilose e, posteriormente em reabsorção por substituição (Lindskog et al., 1985; Hammarström et al., 1986c; Barret e Kenny, 1997; Ne et al., 1999; Andersson et al., 2012). No entanto, não se sabe se este tecido necrótico deveria ser removido ou não da superfície radicular previamente ao reimplante e de que forma isso seria realizado. Alguns autores sugerem que a remoção seja necessária (Mahajan et al., 1981; Percinoto et al., 1988; Panzarini et al., 2008). Por outro lado, recentemente, um estudo que avaliou a presença de anquilose, após extração e reimplante de incisivos de coelhos, demonstrou que não foi observada diferença estatisticamente significativa na anquilose em relação à remoção ou não do ligamento periodontal (Maslamani et al., 2016). Destarte, em um estudo que avaliou o efeito da ausência do cimento na superfície radicular verificou que favorece a penetração de micro-organismos no interior dos túbulos (Alyahya et al., 2017). Sabe-se que a remoção mecânica do ligamento periodontal, realizada com auxílio de curetas, brocas ou lâminas de bisturi (Selvig et al., 1990; Duggal et al., 1994; Kenny et al., 2000), tem sido associada com a remoção do cimento da superfície radicular além do ligamento periodontal necrosado, e a remoção química, feita a partir de substâncias como o hipoclorito de sódio, embora não cause prejuízo à da camada de cimento (Lindskog et al., 1985; Hammarström et al., 1989), foi considerada tóxica para os tecidos periodontais (Chang et al., 2001), relacionada à formação de um tecido conjuntivo semelhante a uma cápsula fibrosa que comprometia a permanência do dente no alvéolo (Sonoda et al., 2000; Kanno et al., 2000) e à maior reabsorção radicular (Sottovia et al., 2006). Dessa forma, no presente estudo nenhuma remoção das fibras do ligamento periodontal foi realizada.

O tipo de contenção tem sido questionado no tratamento de dentes avulsionados, após reimplante, uma vez que foi descrito, especialmente quando rígido, como possível fator desencadeador de anquilose (Anjeles e Moran, 1990). Segundo o Guia da IADT, a utilização de contenção flexível e de curto prazo é preconizada para imobilização de dentes reimplantados (Andersson et al., 2012). No entanto, no presente estudo nenhuma contenção foi realizada, uma vez que foi relatado que a presença de contenção em roedores

pode promover o deslocamento do dente em direção à porção mesial da cavidade bucal e favorecer a ocorrência de anquilose e reabsorção na área (Okamoto e Okamoto, 1995). Ainda, foi descrito que a própria conformação anatômica do incisivo do rato é suficiente para mantê-lo em sua posição original (Okamoto e Okamoto, 1995).

Clinicamente, o diagnóstico da presença de anquilose ainda em estágio precoce é importante, principalmente quando ocorre em um paciente em crescimento, pois a infra-oclusão do dente pode prejudicar o crescimento alveolar e facial a curto, médio e longo prazo (Andersson et al., 2012). Assim, algumas ferramentas têm sido desenvolvidas a fim de facilitar o diagnóstico desta condição pelo cirurgião-dentista. Dentre elas, podemos destacar, o Perioteste[®], que constitui um dispositivo que avalia a mobilidade de um dente (Campbell et al., 2005) e análise de frequência de ressonância, que quantifica a rigidez da conexão dente/implante e osso, atuando de maneira suplementar no diagnóstico de anquilose (Bertl et al., 2012). No entanto, foi verificado que a experiência clínica do cirurgião-dentista poderia detectar, de forma confiável, a presença de anquilose em um dente, a partir de sinais clínicos e radiográficos, como ausência de mobilidade, som metálico à percussão e ausência do espaço do ligamento periodontal (Campbell et al., 2005; Andersson et al., 2012).

A cavidade bucal possui uma microbiota composta por múltiplos micro-organismos, que por meio da saliva ou de infecções odontogênicas têm acesso ao osso, via sulco, e que este processo é facilitado por vários procedimentos cirúrgicos, dos quais as avulsões dentárias, seguidas de reimplante, constituem um bom exemplo (Marcotte et al., 1998; Koller et al., 2000; Paster et al., 2001; Wei et al., 2012). Considerando a possibilidade dos micro-organismos presentes no nosso modelo biológico interferirem nos resultados experimentais, o nosso objetivo foi investigar a distribuição dos micro-organismos na superfície radicular e na superfície óssea dos dentes, após o reimplante. Nossos resultados demonstraram, após o reimplante dentário tardio, a presença de micro-organismo na superfície do dente e do osso. Porém, quando do tratamento de superfície com Denosumab, independente da concentração utilizada, houve uma menor contaminação nos tecidos mineralizados. Futuros estudos devem ser realizados com a finalidade de investigar se esse medicamento apresenta algum potencial antimicrobiano.

A administração sistêmica de antibióticos após o reimplante ainda é questionável, uma vez que estudos clínicos ainda não demonstraram o seu valor (Andersson et al., 2012).

Experimentalmente, efeitos positivos da antibioticoterapia sistêmica foram observados no reparo dos tecidos periodontal e pulpar (Sae-Lim et al., 1998; Hammarstron et al., 1986a; Gomes et al., 2015). Por esta razão, antibióticos são recomendados na maioria das situações após o reimplante. Para administração sistêmica, embora a tetraciclina seja de primeira escolha após reimplante, muitas vezes, apresenta risco potencial de manchamento dos dentes permanentes e, assim em muitos países a tetraciclina não é recomendada. Dessa forma, a fenoximetil penicilina (Pen V) ou amoxicilina, em uma dose apropriada para a idade e o peso do paciente, podem ser administradas como uma excelente opção de tratamento (Andersson et al., 2012; Gomes et al., 2015). Visando reduzir a contaminação bacteriana, neste modelo experimental, foi realizada a antissepsia pré-cirúrgica com clorexidina a 0,12% e a administração pós-operatória de antibiótico 20 000 U.I. de penicilina G benzatina. No entanto, nossos resultados demonstraram que a antibioticoterapia utilizada pode não ter sido suficiente para reduzir a contaminação da superfície radicular via colonização a partir do sulco gengival ou proveniente do ambiente pelo fato de os dentes terem sido mantidos secos em meio extra-oral.

Uma série de tratamentos da superfície radicular para dentes avulsionados, mantidos por longos períodos extra-orais, têm sido discutidos (Lindskog et al., 1985; Selvig et al., 1990; Zervas et al., 1991; Selvig et al., 1992; Duggal et al., 1994; ; Chang et al., 2001; Kenny et al., 2000; Sonoda et al., 2000; Bryson et al., 2002; Trope, 2002; Panzarini et al., 2005; Sottovia et al., 2006; Esper et al., 2007; McIntyre et al., 2007; Panzarini et al., 2008; Chen et al., 2008; Guzmán-Martínez et al., 2009; Kirakozova et al., 2009; Saito, et al., 2011; Barbizan et al., 2015). No entanto, as recomendações atuais para o manejo clínico desses dentes com armazenamento extra-oral prolongado ainda são baseadas na experiência clínica, uma vez que não há evidência robusta o suficiente para que tais tratamentos sejam recomendados (Wiegand e Attin, 2008; Andersson et al., 2012). Por esta razão, existe a necessidade de mais investigações científicas a partir de estudos experimentais *in vivo* sobre os tratamentos tópicos das superfícies radiculares previamente ao reimplante.

Em uma revisão recente da literatura que avaliou os efeitos dos bisfosfonatos quando aplicados sobre a superfície radicular de dentes avulsionados, previamente ao reimplante, revelou que o zolendronato e o alendronato apresentaram uma redução da reabsorção radicular, em modelo animal (Najeeb et al., 2017). No entanto, os bisfosfonatos não tiveram efeito no controle da anquilose (Lustosa-Pereira et al., 2006; Komatsu et al.,

2008; Najeeb et al., 2017). Diferentemente, nossos resultados demonstraram que o Denosumab a 60 mg/mL induziu a anquilose no período de 15 dias, porém após 60 dias tanto a anquilose como a reabsorção por substituição foram menores do que o grupo controle. Estes resultados indicam que esse processo de anquilose induzido pelo medicamento foi transitório.

Ainda, marcações positivas para a molécula RANKL foram observadas ao redor do dente e nos osteoblastos alinhados ao osso alveolar, após reimplante tardio. Nossos resultados estão em concordância com outro estudo que detectou a marcação de RANKL, após o reimplante tardio (Manfrin et al., 2013). Por outro lado, não foi observada a síntese de OPG, um inibidor fisiológico de RANKL. O tratamento com Denosumab, por sua vez, inibiu RANKL sem modular OPG. Esses resultados podem indicar o grande potencial de Denosumab em controlar eventos indesejáveis, como a anquilose, após reimplante de dentes avulsionados. A Periostina foi observada no ligamento periodontal dos dentes reimplantados. Porém, essa marcação estava ausente nas áreas de anquilose, indicando que durante esse processo, há inibição da síntese de periostina resultando na fusão do osso à superfície radicular.

Conclusões

CONCLUSÕES

Este trabalho foi proposto com a finalidade de fornecer subsídios para aprimorar as condutas clínicas e, assim, o prognóstico de dentes avulsionados. Para tanto foi realizada uma revisão sistemática da literatura e um estudo experimental em modelo animal.

Primeiramente, pode-se observar que até o momento a literatura científica atual não fornece evidência suficiente para estabelecer qual é o melhor meio de conservação para manutenção de dentes avulsionados previamente ao reimplante dentário. Dentre os meios que foram encontrados estão a água de coco, água da torneira, leite de soja, leite integral, solução salina, saliva, própolis, soro fisiológico, solução Euro-Collins, solução salina balanceada de Hank's (HBSS) e Viaspan®. Ainda que esta revisão tenha sido conduzida em modelo animal experimental, a baixa qualidade dos estudos bem como a sua heterogeneidade indica que a extrapolação para humanos deva ser cautelosa.

A seguir, considerando que a necessidade de tratamento de superfície é frequente, foi avaliado se essa terapia poderia impedir os efeitos adversos do reimplante tardio. Foi observado que o tratamento de superfície com Denosumab 60 mg/mL preveniu a anquilose, a reabsorção por substituição e a reabsorção dentária, comparado com o grupo sem tratamento, após 60 dias. Interessantemente, após o reimplante dentário tardio houve reabsorção do tecido ósseo alveolar, com presença de células inflamatórias e presença de micro-organismos na superfície do dente e do osso. Porém, frente ao tratamento de superfície com Denosumab, independente da concentração utilizada, houve uma menor contaminação nos tecidos mineralizados. Marcações positivas para a molécula pró-reabsorção RANKL foram observadas ao redor do dente e nos osteoblastos alinhados ao osso alveolar, após reimplante tardio. Por outro lado, não foi observada síntese de OPG, um inibidor fisiológico de RANKL. O tratamento com Denosumab inibiu a síntese de RANKL sem modular OPG. Finalmente, no ligamento periodontal de dentes reimplantados foi observada a presença de Periostina. Porém, essa marcação estava ausente nas áreas de anquilose, em ambos os períodos experimentais, indicando que durante o processo de anquilose a síntese de periostina é inibida, o que resulta na fusão do osso à superfície radicular.

Referências

REFERÊNCIAS

- Ain TS, Lingesha Telgi R, Sultan S, Tangade P, Ravishankar Telgi C, Tirth A, *et al.* Prevalence of traumatic dental injuries to anterior teeth of 12-year-old school children in Kashmir, India. *Arch Trauma Res* 2016;5(1):e24596.
- Al-Asfour A, Andersson L. The effect of a leaflet given to parents for first aid measures after tooth avulsion. *Dent Traumatol* 2008;24(5):515-21.
- Alexander, PC. Replantation of teeth. *Oral Surg* 1956; 19(1):110-9.
- Al-Jundi SH. Type of treatment, prognosis, and estimation of time spent to manage dental trauma in late presentation cases at a dental teaching hospital: a longitudinal and retrospective study. *Dent Traumatol* 2004;20(1):1-5.
- Alyahya A, Alqareer A. Does the Removal of Cementum Facilitate Bacterial Penetration into Dentinal Tubules In Vitro? *J Endod* 2017;[Epub ahead of print].
- American Association of Endodontists. Recommended Guidelines for Treatment of the Avulsed Tooth. Chicago, IL:American Association of Endodontists; 1995.
- Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tomestko ME, Roux ER, *et al.* A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997;390:175-179.
- Andersson L, Andreasen JO, Day P, Heithersay G, Trope M, Diangelis AJ, *et al.* International Association of Dental Traumatology. Guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2. Avulsion of permanent teeth. *Dent Traumatol* 2012;28(2):88-96.
- Andersson L, Blomlöf L, Lindskog S, Feiglin B, Hammarström L. Tooth ankylosis. Clinical, radiographic and histological assessments. *Int J Oral Surg* 1984;13(5):423-31.
- Andersson L, Bodin I, Sorensen S. Progression of root resorption following replantation of human teeth after extended extraoral storage. *Endod Dent Traumatol* 1989;5:38-47.
- Andersson L. Epidemiology of traumatic dental injuries. *Pediatr Dent* 2013;35(2):102-5.
- Andersson L. New guidelines for treatment of avulsed permanent teeth. *Dent Traumatol* 2012;28(2):87.
- Andreasen JO. A time-related study of periodontal healing and root resorption activity after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Swed Dent J* 1980;4(3):101-10. (a)

Andreasen JO, Ahrensburg SS, Tendal B. Inappropriate use of meta-analysis in an evidence-based assessment of the clinical guidelines for replanted avulsed teeth. Timing of pulp extirpation, splinting periods and prescription of systemic antibiotics. *Dent Traumatol* 2010;26:451-452.

Andreasen JO, Andersson L. Critical considerations when planning experimental in vivo studies in dental traumatology. *Dent Traumatol* 2011;27:275-280.

Andreasen JO, Andreasen FM. Avulsions. In: Andreasen JO, Andreasen FM, Andersson L, editors. *Textbook and color atlas of traumatic Injuries to the teeth*, 4th edn. Oxford. UK: Wiley-Blackwell; 2007. p.444-88.

Andreasen JO, Andreasen FM. *Textbook and atlas of traumatic injuries to the teeth*, 3^a ed. Copenhagen Munksgaard; 1994.

Andreasen JO, Bakland LK, Matras RC, Andreasen FM. Traumatic intrusion of permanent teeth. Part 1. An epidemiological study of 216 intruded permanent teeth. *Dent Traumatol* 2006;22(2):83-9.

Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 1. Diagnosis of healing complications. *Endod Dent Traumatol* 1995;11:51-8.

Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 4. Factors related to periodontal ligament healing. *Endod Dent Traumatol* 1995;11:76-89.

Andreasen JO. Effect of extra-alveolar period and storage media upon periodontal and pulpal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Int J Oral Surg* 1981;10:43-53.

Andreasen JO. Etiology and pathogenesis of traumatic dental injuries. A clinical study of 1298 cases. *Scand J Dent Res* 1970;78:329-42.

Andreasen, JO. External root resorption: its implication in dental traumatology, paedodontics, periodontics, orthodontics and endodontics. *Int Endod* 1985;18:109-18.

Andreasen JO, Hjorting-Hansen E. Replantation of teeth. II. Histological study of 22 replanted anterior teeth in humans. *Acta Odontol Scand* 1966;24(3):287-306.

Andreasen JO, Kristerson L. The effect of extra-alveolar root filling with calcium hydroxide on periodontal healing after replantation of permanent incisors in monkeys. *J Endod* 1981a;7:349-54.

Andreasen JO, Kristerson L. The effect of limited drying or removal of the periodontal ligament periodontal healing after replantation of mature permanent incisors in monkey. *Acta Odont Scand* 1981b;39:1–13.

Andreasen JO, Lauridsen E, Andreasen FM. Contradictions in the treatment of traumatic dental injuries and ways to proceed in dental trauma research. *Dent Traumatol* 2010;26:16-22.

Andreasen JO. Periodontal healing after replantation of traumatically avulsed human teeth. Assesment by mobility testing and radiography. *Acta Odontol Scand* 1975;33:325-35.

Andreasen JO. The effect of removal of the coagulum in the alveolus before replantation upon periodontal and pulpal healing of mature permanent incisors in monkeys. *Int J Oral Surg* 1980b;9(6):458-61.

Anjeles TE, Moran MH. Splinting of traumatized anterior teeth using the nylon- resin technic. *ADM, México*, 1990;47(3):137-141.

Ashkenazi M, Sarnat H, Keila S. In vitro viability, mitogenicity and clonogenic capacity of periodontal ligament cells after storage in six different media. *Endod Dent Traumatol* 1999;15:149–56.

Augoulea A, Tsakonas E, Triantafyllopoulos I, Rizos D, Armeni E, Tsoltos N, *et al.* Comparative effects of denosumab or bisphosphonate treatment on bone mineral density and calcium metabolism in postmenopausal women. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2017;17(1):444-449.

Baltacioglu E, Tasdemir T, Yuva P, Celik D, Sukuroglu E. Intentional replantation of periodontally hopeless teeth using a combination of enamel matrix derivative and demineralized freeze-dried bone allograft. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2011;31(1):75-81.

Barbizam JV, Massarwa R, da Silva LA, da Silva RA, Nelson-Filho P, Consolaro A, *et al.* Histopathological evaluation of the effects of variable extraoral dry times and enamel matrix proteins (enamel matrix derivatives) application on replanted dogs' teeth. *Dent Traumatol* 2015;31(1):29-34.

Barrett EJ, Kenny DJ. Avulsed permanent teeth: a review of the literature and treatment guidelines. *Endod Dent Traumatol* 1997;13(4):153-63.

Bastos JV, Côrtes MI, Silva JF, Goulart EM, Colosimo EA, Gomez RS, *et al.* A study of the interleukin-1 gene cluster polymorphisms and inflammatory external root resorption in replanted permanent teeth. *Int Endod J* 2015;48(9):878-87.

Bekker PJ, Holloway DL, Rasmussen AS, Murphy R, Martin SW, Leese PT, *et al.* A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2004;19:1059-1066.

Bendo CB, Paiva SM, Oliveira AC, Goursand D, Torres CS, Pordeus IA, *et al.* Prevalence and associated factors of traumatic dental injuries in Brazilian schoolchildren. *J Public Health Dent* 2010;70(4):313-8.

Bertl MH, Weinberger T, Schwarz K, Gruber R, Crismani AG. Resonance frequency analysis: a new diagnostic tool for dental ankylosis. *Eur J Oral Sci* 2012;120(3):255-8.

Biagi R. Pulp and periodontal healing after replantation of a maxillary immature incisor: a 13-year follow-up. *Eur J Paediatr Dent* 2014;15(2 Suppl):195-8.

Black AM, Eliason PH, Patton DA, Emery CA. Epidemiology of Facial Injuries in Sport. *Clin Sports Med* 2017;36(2):237-255.

Bonini GC, Bönecker M, Braga MM, Mendes FM. Combined effect of anterior malocclusion and inadequate lip coverage on dental trauma in primary teeth. *Dent Traumatol* 2012;28(6):437-40.

Borssén E, Holm AK. Traumatic dental injuries in a cohort of 16-year-olds in northern Sweden. *Endod Dent Traumatol* 1997;13(6):276-80.

Boyce RW, Varela A, Chouinard L, Bussiere JL, Chellman GJ, Ominsky MS, *et al.* Infant cynomolgus monkeys exposed to denosumab in utero exhibit an osteoclast-poor osteopetrotic-like skeletal phenotype at birth and in the early postnatal period. *Bone* 2014;64:314-25.

Bryson EC, Levin L, Banchs F, Abbott PV, Trope M. Effect of immediate intracanal placement of Ledermix Paste(R) on healing of replanted dog teeth after extended dry times. *Dent Traumatol* 2002;18(6):316-21.

Bryson EC, Levin L, Banchs F, Trope M. Effect of minocycline on healing of replanted dog teeth after extended dry times. *Dent Traumatol* 2003;19(2):90-5.

Burstone MS. Histochemical demonstration of acid phosphatase activity in osteoclasts. *J Histochem Cytochem* 1959;7: 39-41.

Butcher EO, Vidair RV. Periodontal fiber reattachment in replanted incisors of the monkey. *J Dent Res* 1955;34(4):569-76.

Buttke TM, Trope M. Effect of catalase supplementation in storage media for avulsed teeth. *Dent Traumatol* 2003;19:103-108.

- Caffesse RG, Nasjleti CE, Castelli WA. Long-term results after intentional tooth reimplantation in monkeys. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1977;44(5):666-78.
- Caglar E, Sandalli N, Kusu OO, Durhan MA, Pisiriciler R, Caliskan EA, *et al.* Viability of fibroblasts in a novel probiotic storage media. *Dent Traumatol* 2010;26:383-387.
- Campbell KM, Casas MJ, Kenny DJ, Chau T. Diagnosis of ankylosis in permanent incisors by expert ratings, Periotest and digital sound wave analysis. *Dent Traumatol* 2005;21(4):206-12.
- Cardos LC, Poi WR, Panzarini SR, Sonoda CK, Rodrigues TS, Manfrin TM. Knowledge of firefighters with special paramedic training of the emergency management of avulsed teeth. *Dent Traumatol* 2009;25:58-63.
- Carvalho ED, Rosa RH, Pereira FM, Anbinder AL, Mello I, Habitante SM, *et al.* Effects of diode laser irradiation and fibroblast growth factor on periodontal healing of replanted teeth after extended extra-oral dry time. *Dent Traumatol* 2017;33(2):91-99.
- Cavalcanti AL, Bezerra PK, de Alencar CR, Moura C. Traumatic anterior dental injuries in 7-to 12-years-old Brazilian children. *Dent Traumatol* 2009;25(2):198-202.
- Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;92:446–50.
- Chen H, Teixeira FB, Ritter AL, Levin L, Trope M. The effect of intracanal anti-inflammatory medicaments on external root resorption of replanted dog teeth after extended extra-oral dry time. *Dent Traumatol* 2008;24:74–8.
- Chen YL, Tsai TP, See LC. Survey of incisor trauma in second grade students of central Taiwan. *Changgeng Yi Xue Za Zhi* 1999;22(2):212-9.
- Christgau M, Caffesse RG, Schmalz G, D'Souza RN. Extracellular matrix expression and periodontal wound-healing dynamics following guided tissue regeneration therapy in canine furcation defects. *J Clin Periodontol* 2007;34(8):691-708.
- Citrome GP, Kaminski EJ, Heuer MA. A comparative study of tooth apexification in the dog. *J Endod* 1979;5:290-297.
- Cohenca N, Roges RA, Roges R. The incidence and severity of dental trauma in intercollegiate athletes. *J Am Dent Assoc* 2007;138(8):1121–1126.
- Consolaro, A. Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas. Maringá: Dental Press; 2005.

Consolaro, A. Tensão nas áreas de compressão do ligamento periodontal durante o movimento ortodôntico. E os binômios? *Rev Clin Ortodon Dental Press* 2007;6:107-110.

Cunha RF, Pavarini A, Percinoto C, Lima JE. Influence of surgical repositioning of mature permanent dog teeth following experimental intrusion: a histologic assessment. *Dent Traumatol* 2002;18:304–308.

Curioni-Fontecedro A, Husmann L, Soldini D, Stahel RA. Primary non-small cell lung cancer response upon treatment with denosumab. *Lung Cancer* 2013;82(3):506-8.

Damé-Teixeira N, Alves LS, Susin C, Maltz M. Traumatic dental injury among 12-year-old South Brazilian schoolchildren: prevalence, severity, and risk indicators. *Dent Traumatol* 2012;29(1):52-8.

de Paula Reis MV, Moura CC, Soares PB, Leoni GB, Souza-Neto MD, Barbosa DZ, *et al.* Histologic and micro-computed tomographic analyses of replanted teeth stored in different kind of media. *J Endod* 2014;40:665-669.

de Souza Gomes WD, Silva CA, Melo ME, da Silva VF, de Almeida MM, Pedrini D, *et al.* Delayed tooth replantation in rats: effect of systemic antibiotic therapy with amoxicillin and tetracycline. *Dent Traumatol* 2015; [Epub ahead of print].

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997;89(5):747-54.

Duggal MS, Toumba KJ, Russell JL, Paterson SA. Replantation of avulsed permanent teeth with a vital periodontal ligaments: case report. *Endod Dent Traumatol* 1994;10:282–5.

Dunsha T, Hovlland EJ. Evaluation of long-term calcium hydroxide treatment in avulsed teeth: an vivo study. *Int Endod J* 1995;28:7–11.

Eilert-Petersson E, Andersson L, Sörensen S. Traumatic oral vs. non-oral injuries. An epidemiological study during one year in a Swedih country. *Swed Dent J* 1997;21:55-68.

Engbaek K, Johansen KS, Jensen ME. A new technique for Gram staining paraffin-embedded tissue. *J Clin Pathol* 1979;32(2):187-90.

Esper HR, Panzarini SR, Poi WR, Sonoda CK, Casatti CA. Mechanical removal of necrotic periodontal ligament by either Robinson bristle brush with pumice or scalpel blade. Histomorphometric analysis and scanning electron microscopy. *Dent Traumatol* 2007;23:333–9.

Felippe WT, Felipe MC, Rocha MJ. The effect of mineral trioxide aggregate on the apexification and periapical healing of teeth with incomplete root formation. *Int Endod J* 2006;39:2–9.

Flores MT, Andreasen JO, Bakland LK, Feiglin B, Gutmann JL, Oikarinen K, *et al.* Guidelines for the evaluation and management of traumatic dental injuries. *Dent Traumatol* 2001;17(5):193–6.

Francisco SS, Filho FJ, Pinheiro ET, Murrer RD, De Jesus Soares A. Prevalence of traumatic dental injuries and associated factors among Brazilian schoolchildren. *Oral Health Prev Dent* 2013;11(1):31-8.

Frontera RR, Zanin L, Ambrosano GM, Flório FM. Orofacial trauma in Brazilian basketball players and level of information concerning trauma and mouthguards. *Dent Traumatol* 2011;27(3):208-16.

Glendor U. Aetiology and risk factors related to traumatic dental injuries--a review of the literature. *Dent Traumatol* 2009;25(1):19-31.

Glendor U, Andersson L. Public health aspects of oral diseases and disorders: dental trauma. *Quintessence* 2007:203-11.

Glendor U. Epidemiology of traumatic dental injuries--a 12 year review of the literature. *Dent Traumatol* 2008;24(6):603-11.

Glendor U, Halling A, Andersson L, Eilert-Petersson E. Incidence of traumatic tooth injuries in children and adolescents in the county of Västmanland, Sweden. *Swed Dent J* 1996;20(1-2):15-28.

Gokhale SR, Padhye AM. Future prospects of systemic host modulatory agents in periodontal therapy. *Br Dent J* 2013;214(9):467-71.

Gomes WD, Silva CA, Melo ME, Silva VF, Almeida MM, Pedrini D, *et al.* Delayed tooth replantation in rats: effect of systemic antibiotic therapy with amoxicillin and tetracycline. *Dent Traumatol* 2015;31(6):448-56.

Granville-Garcia AF, De Menezes VA, De Lira PI. Dental trauma and associated factors in Brazilian preschoolers. *Dent Traumatol* 2006;22(6):318-22.

Grossman LI, Ship II. Survival rate of replanted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1970;29:899–906.

Guedes OA, de Alencar AH, Lopes LG, Pécora JD, Estrela C. A retrospective study of traumatic dental injuries in a Brazilian dental urgency service. *Braz Dent J* 2010;21(2):153-7.

Gulinelli JL, Panzarini SR, Fattah CM, Poi WR, Sonoda CK, Negri MR, *et al.* Effect of root surface treatment with propolis and fluoride in delayed tooth replantation in rats. *Dent Traumatol* 2008;24:651–7.

Guyatt G, Oxman AD, Akl EA, Kunz R, Vist G, Brozek J, *et al.* GRADE guidelines: 1. Introduction-GRADE evidence profiles and summary of findings tables. *J Clin Epidemiol* 2011;64:383-394.

Guzmán-Martínez N, Silva-Herzog FD, Méndez GV, Martín-Pérez S, Cerda-Cristerna BI, Cohenca N. The effect of Emdogain and 24% EDTA root conditioning on periodontal healing of replanted dog's teeth. *Dent Traumatol* 2009; 25(1):43-50.

Hammarström L, Blomlöf L, Feiglin B, Andersson L, Lindskog S. Replantation of teeth and antibiotic treatment. *Endod Dent Traumatol* 1986a;2:51-57.

Hammarström L, Blomlöf L, Feiglin B, Lindskog S. Effect of calcium hydroxide treatment on periodontal repair and root resorption. *Endod Dent Traumatol* 1986b;2:184-9.

Hammarstrom L, Blomlof L, Lindskog S. Dynamics of dentoalveolar ankylosis and associated root resorption. *Endod Dent Traumatol* 1989; 5:163-75.

Hammarström L, Lindskog S. Factors regulating and modifying dental root resorption. *Proc Finn Dent Soc* 1992; 88(1):115-23.

Hammarström L, Pierce A, Blomlöf L, Feiglin B, Lindskog S. Tooth avulsion and replantation--a review. *Endod Dent Traumatol* 1986c;2(1):1-8.

Hellsing E, Alatli-Kut I, Hammarström L. Experimentally induced dentoalveolar ankylosis in rats. *Int Endod J* 1993;26(2):93-8.

Henry DH, Costa L, Goldwasser F, Hirsh V, Hungria V, Prausova J, *et al.* Randomized, double-blind study of denosumab versus zoledronic acid in the treatment of bone metastases in patients with advanced cancer (excluding breast and prostate cancer) or multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2011;29:1125-32.

Heymann MF, Riet A, Le Goff B, Battaglia S, Paineau J, Heymann D. OPG, RANK and RANK ligand expression in thyroid lesions. *Regul Pept* 2008;148:46-53.

Hinckfuss SE, Messer LB. An evidence-based assessment of the clinical guidelines for replanted avulsed teeth. Part II: prescription of systemic antibiotics. *Dent Traumatol* 2009;25:158-164.

Horiuchi K, Amizuka N, Takeshita S, Takamatsu H, Katsuura M, Ozawa H, *et al.* Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta. *J Bone Miner Res* 1999;14(7):1239-49.

Huang W, Carlsen B, Rudkin G, Berry M, Ishida K, Yamaguchi DT, *et al.* Osteopontin is a negative regulator of proliferation and differentiation in MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells. *Bone* 2004;34(5):799-808.

Inouye J, McGrew C. Dental problems in athletes *Curr Sports Med Rep* 2015;14(1):27–33.

Iqbal MK, Bamaas N. Effect of enamel matrix derivative (EMDOGAIN) upon periodontal healing after replantation of permanent incisors in beagle dogs. *Dent Traumatol* 2001; 17(1):36-45.

Järvinen S. Traumatic injuries to upper permanent incisors related to age and incisal overjet. A retrospective study. *Acta Odontol Scand* 1979;37(6):335-8.

Kanno CM, Neto MS, Sundfeld MLMM, Velasco-Bohrques. Effects of sodium hypochlorite on periodontal healing after tooth replantation - histomorphometric study in rats. *Pesq Odont Bras* 2000;14(2):151-157.

Karande N, Shah P, Bhatia M, Lakade L, Bijle MN, Arora N, *et al.* Assessment of awareness amongst school teachers regarding prevention and emergency management of dentoalveolar traumatic injuries in school children in Pune City, before and 3 months after dental educational program. *J Contemp Dent Pract* 2012;13(6):873-7.

Karayilmaz H, Kirzioglu Z, Erken Gungor O. Aetiology, treatment patterns and long-term outcomes of tooth avulsion in children and adolescents. *Pak J Med Sci* 2013;29(2):464-8.

Kartsogianinnis V, Zhou H, Horwood NJ, Thomas RJ, Hards DK, Quinn JM, *et al.* Localization of RANKL (receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. *Bone* 1999; 25:525–34.

Keizer RJ, Huitema ADR, Schellens JHM, Beijnen JH. Clinical pharmacokinetics of therapeutic monoclonal antibodies. *Clin Pharmacokinet* 2010;49:493-507.

Keklikoglu N, Asci SK. Histological evaluation of a replanted tooth retained for 49 years. *Dent Traumatol* 2006; 22(3):157-9.

Kenny DJ, Barrett EJ, Johnston DH, Sigal MJ, Tenenbaum HC. Clinical management of avulsed permanent incisors using Emdogain: initial report of an investigation. *J Can Dent Assoc* 2000;66:21.

Kirakozova A, Teixeira FB, Curran AE, Gu F, Tawil PZ, Trope M. Effect of intracanal corticosteroids on healing of replanted dog teeth after extended dry times. *J Endod* 2009;35(5):663-7.

Klinge B, Nilvéus R, Selvig KA. The effect of citric acid on repair after delayed tooth replantation in dogs. *Acta Odontol Scand* 1984;42(6):351-9.

Koller MM, Purushotham KR, Maeda N, Scarpace PJ, HumphreysBeher MG. Desipramine induced changes in salivary proteins, cultivable oral microbiota and gingival health in aging female NIA Fischer 344 rats. *Life Sci* 2000;68:445-55.

Komatsu K, Shimada A, Shibata T, Wada S, Ideno H, Nakashima K, *et al.* Alendronate promotes bone formation by inhibiting protein prenylation in osteoblasts in rat toothreplantation model. *J Endocrinol* 2013;219(2):145-58.

Kum KY, Kwon OT, Spångberg LS, Kim CK, Kim J, Cho MI, *et al.* Effect of dexamethasone on root resorption after delayed replantation of rat tooth. *J Endod* 2003;29(12):810-3.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, *et al.* Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165–76.

Lam K, Sae-Lim V. The effect of Emdogain gel on periodontal healing in replanted monkeys' teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:100–7.

Levin L, Bryson EC, Caplan D, Trope M. Effect of topical alendronate on root resorption of dried replanted dog teeth. *Dent Traumatol* 2001;17(3):120-6.

Lewiecki EM. Denosumab: an investigational drug for the management of postmenopausal osteoporosis. *Biologics* 2008;2:645-653.

Lindskog S, Pierce AM, Blomlof L, Hammarstrom L. The role of the necrotic periodontal membrane in cementum resorption and ankylosis. *Endod Dent Traumatol* 1985;1(3):96-101.

Lipton A, Fizazi K, Stopeck AT, Henry DH, Brown JE, Yardley DA, *et al.* Superiority of denosumab to zoledronic acid for prevention of skeletal-related events: a combined analysis of 3 pivotal, randomised, phase 3 trials. *Eur J Cancer* 2012;48:3082-3092.

Löe H, Waerhaug J. Experimental replantation of teeth in dogs and monkeys. *Arch oral Biol* 1961;3:176–84.

Longo DL, Paula-Silva FWG, Barbizam JV, Cohenca N, Silva LAB. Reimplante dentário tardio - mediadores envolvidos nas reabsorções inflamatória e de substituição. In: 38ª Jornada Odontológica de Ribeirão Preto, 2016, Ribeirão Preto. Anais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2016;29:107.

Loo WT, Dou YD, Chou WK, Wang M. Thymosin alpha 1 provides short-term and long-term benefits in the reimplantation of avulsed teeth: a double-blind randomized control pilot study. *Am J Emerg Med* 2008;26:574–7.

Lustosa-Pereira A, Garcia RB, de Moraes IG, Bernardineli N, Bramante CM, Bortoluzzi EA. Evaluation of the topical effect of alendronate on the root surface of extracted and replanted teeth. Microscopic analysis on rats' teeth. *Dent Traumatol* 2006;22:30–5.

Mahajan SK, Sidhu SS. Effect of fluoride on root resorption of autogenous dental replants. Clinical study. *Aust Dent J* 1981;26:42–5.

Malmgren B, Malmgren O. Rate of infraposition of reimplanted ankylosed incisors related to age and growth in children and adolescents. *Dental Traumatol* 2002;18(1):28-36.

Manfrin TM, Poi WR, Okamoto R, Panzarini SR, Sonoda CK, Saito CT, *et al.* Expression of OPG, RANK, and RANKL proteins in tooth repair processes after immediate and delayed tooth. *J Craniofac Surg* 2013;24(1):e74-80.

Marcotte H, Lavoie MC. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:71109.

Martins VM, Sousa RV, Rocha ES, Leite RB, Paiva SM, Granville-Garcia AF. Dental trauma among Brazilian schoolchildren: prevalence, treatment and associated factors. *Eur Arch Paediatr Dent* 2012;13(5):232-7.

Maslamani M, Almusawi A, Joseph B, Gabato S, Andersson L. An experimental model for studies on delayed tooth replantation and ankylosis in rabbits. *Dent Traumatol* 2016;32(6):443-449.

Matos Fde S, Godolphim Fde J, Correia AM, de Albuquerque Júnior RL, Paranhos LR, Rode Sde M, *et al.* Effect of laser photobiomodulation on the periodontal repair process of replanted teeth. *Dent Traumatol* 2016;32(5):402-8.

McIntyre JD, Lee JY, Trope M, Vann WF Jr. Management of avulsed permanent incisors: a comprehensive update. *Pediatr Dent* 2007;29:56–63.

Melo ME, Silva CA, de Souza Gomes WD, da Silva VF, Brandini DA, Poi WR, *et al.* Immediate tooth replantation in rats: effect of systemic antibiotic therapy with amoxicillin and tetracycline. *Clin Oral Investig* 2016;20(3):523-32.

Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. PRISMA Group. Reprint--preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Phys Ther* 2009;89(9):873-80.

Moretton TR, Brown CE Jr, Legan JJ, Kafrawy AH. Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of mineral trioxide aggregate and ethoxybenzoic acid cement. *J Biomed Mater Res* 2000;52:528-533.

Mori GG, Castilho LR, Nunes DC, Turcio KH, Molina RO. Avulsion of permanent teeth: analysis of the efficacy of an informative campaign for professionals from elementary schools. *J Appl Oral Sci* 2007;15(6):534-8.

Mori GG, Moraes IG, Nunes DC, Castilho LR, Poi WR. Biocompatibility of acetazolamide pastes in the subcutaneous tissue of rats. *Braz Dent J* 2009;20(1):17-21.

Mori GG, Nunes DC, Castilho LR, de Moraes IG, Poi WR. Propolis as storage media for avulsed teeth: microscopic and morphometric analysis in rats. *Dent Traumatol* 2010;26:80-85.

Mori GG, Poi WR, Castilho LR. Evaluation of the anti-resorptive ability of an experimental acetazolamide paste for the treatment of late replanted teeth: a study in rats. *Dent Traumatol* 2013;29(1):34-40.

Mould DR, Green B. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies: concepts and lessons for drug development. *BioDrugs* 2010;24:23-39.

Najeeb S, Siddiqui F, Khurshid Z, Zohaib S, Zafar MS, Ansari SA. Effect of bisphosphonates on root resorption after tooth replantation - a systematic review. *Dent Traumatol* 2017;33(2):77-83.

Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, *et al.* The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 2002;108(1):17-29.

Narimatsu K, Li M, de Freitas PH, Sultana S, Ubaidus S, Kojima T, *et al.* Ultrastructural observation on cells meeting the histological criteria for preosteoblasts--a study in the mouse tibial metaphysis. *J Electron Microsc* 2010;59(5):427-36.

Navabazam A, Farahani SS. Prevalence of traumatic injuries to maxillary permanent teeth in 9- to 14-year-old school children in Yazd, Iran. *Dent Traumatol* 2010;26(2):154-7.

Ne RF, Witherspoon DE, Gutmann JL. Tooth resorption. *Quintessence Int.* 1999;30(1):9-25.

Negri MR, Panzarini SR, Poi WR, Sonoda CK, Gulinelli JL, Saito CT. Analysis of the healing process in delayed tooth replantation after root canal filling with calcium hydroxide, Sealapex and Endofill: a microscopic study in rats. *Dent Traumatol* 2008;24(6):645-50.

Nevins AJ, La Porta RF, Borden BG, Lorenzo P. Replantation of enzymatically treated teeth in monkeys. Part I. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1980;50:277-81.

Nicolau B, Marcenes W, Sheiham A. Prevalence, causes and correlates of traumatic injuries among 13-years-old in Brazil. *Dental Traumatol* 2001;17(5):213-217.

Nishioka M, Shiiya T, Ueno K, Suda H. Tooth replantation in germ-free and conventional rats. *Endod Dent Traumatol* 1998;14(4):163-73.

Oikarinen K, Kassila O. Causes and types of traumatic tooth injuries treated in a public dental health clinic. *Endod Dent Traumatol* 1987;3(4):172-7.

Okamoto, T; Okamoto, R. Interferência da imobilização sobre o processo de reparação após o reimplante imediato de incisivo superior de rato. Estudo histomofológico. *Rev Odont UNESP* 1995;24:87-98.

Oliveira TM, Sakai VT, Moretti AB, Silva TC, Santos CF, Machado MA. Knowledge and attitude of mothers with regards to emergency management of dental avulsion. *J Dent Child* 2007;74(3):200-2.

Ozer S, Yilmaz EI, Bayrak S, Tunc ES. Parental knowledge and attitudes regarding the emergency treatment of avulsed permanent teeth. *Eur J Dent* 2012;6(4):370-5.

Paiva PC, Paiva HN, Oliveira Filho PM, Lamounier JA, Ferreira RC, Ferreira EF, *et al.* Prevalence of traumatic dental injuries and its association with binge drinking among 12-year-olds: a population-based study. *Int J Paediatr Dent* 2015;25(4):239-47.

Panzarini SR, Gulinelli JL, Poi WR, Sonoda CK, Pedrini D, Brandini DA. Treatment of root surface in delayed tooth replantation: a review of literature. *Dent Traumatol* 2008;24:277-82.

Panzarini SR, Gulinelli JL, Saito CT, Poi WR, Sonoda CK, Américo de Oliveira J, *et al.* Short-term vs long-term calcium hydroxide therapy after immediate tooth replantation: a histomorphometric study in monkey's teeth. *Dent Traumatol* 2012a;28(3):226-32.

Panzarini SR, Holland R, de Souza V, Poi WR, Sonoda CK, Pedrini D. Mineral trioxide aggregate as root canal filling material in reimplanted teeth. Microscopic analysis in monkeys. *Dent Traumatol* 2007;23(5):265-72.

Panzarini SR, Nonato CC, Gulinelli JL, Poi WR, Sonoda CK, Saito CT, *et al.* Effect of the treatment of root surface-adhered necrotic periodontal ligament with propolis or fluoride in delayed rat tooth replantation. *Clin Oral Invest* 2014a;18(4):1329-33.

Panzarini SR, Perri de Carvalho AC, Poi WR, Sonoda CK. Use of vitamin C in delayed tooth replantation. *Braz Dent J* 2005;16:17-22.

Panzarini SR, Saad-Neto M, Sonoda C, Poi WR, Perri de Carvalho AC. Dental avulsion in young and adult patients in the region of Aracatuba. *Rev Assoc Paul Cir Dent* 2003;57:27-31.

Panzarini SR, Sonoda CK, Saito CT, Hamanaka EF, Poi WR. Delayed tooth replantation: MTA as root canal filling. *Braz Oral Res* 2014b;28:1-7.

Panzarini SR, Trevisan CL, Brandini DA, Poi WR, Sonoda CK, Luvizuto ER, *et al.* Intracanal dressing and root canal filling materials in tooth replantation: a literature review. *Dent Traumatol* 2012b;28(1):42-8.

Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, *et al.* Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001;183:3770-83.

Pavek DI, Radtke PK. Postreplantation management of avulsed teeth: an endodontic literature review. *Gen Dent* 2000;48:176–81.

Percinoto C, Russo MC, Lima JEO, Andrioni JN, Benfatti SV, Bertoz FA. Repair process in replanted teeth after chemical removal of periodontal root fibers. *Rev Odontol UNESP* 1988;17:73–81.

Perheentupa U, Laukkanen P, Veijola J, Joukamaa M, Järvelin MR, Laitinen J, *et al.* Increased lifetime prevalence of dental trauma is associated with previous non-dental injuries, mental distress and high alcohol consumption. *Dent Traumatol* 2001;17(1):10-6.

Pettiette M, Hupp J, Mesaros S, Trope M. Periodontal healing of extracted dogs' teeth air-dried for extended periods and soaked in various media. *Endod Dent Traumatol* 1997;13(3):113-118.

Pi SH, Lee SK, Hwang YS, Choi MG, Lee SK, Kim EC. Differential expression of periodontal ligament-specific markers and osteogenic differentiation in human papilloma virus 16-immortalized human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *J Periodontal Res* 2007;42(2):104-13.

Pigatto Mitihiro D, de Paula Ramos S, Corazza Montero J, Alves Campos A, de Oliveira Toginho Filho D, Dezan Garbelini CC. Effects of near-infrared LED therapy on experimental tooth replantation in rats. *Dent Traumatol* 2017;33(1):32-37.

Poi WR, Carvalho RM, Panzarini SR, Sonoda CK, Manfrin TM, Rodrigues TS. Influence of enamel matrix derivative (Emdogain) and sodium fluoride on the healing process in delayed tooth replantation: histologic and histometric analysis in rats. *Dent Traumatol* 2007;23:35–41.

Poi WR, Sonoda CK, Martins CM, Melo ME, Pellizzer EP, de Mendonça MR, *et al.* Storage media for avulsed teeth: a literature review. *Braz Dent J* 2013;24:437-445.

Polson AM, Proye MP. Effect of root surface alterations on periodontal healing. II. Citric acid treatment of the denuded root. *J Clin Periodontol* 1982;9(6):441-54.

Qaseem A, Forciea MA, McLean RM, Denberg TD. Clinical Guidelines Committee of the American College of Physicians. Treatment of Low Bone Density or Osteoporosis to Prevent

Fractures in Men and Women: A Clinical Practice Guideline Update from the American College of Physicians. *Ann Intern Med* 2017; Epub ahead of print.

Ricieri CB, Sonoda CK, Aranega AM, Panzarini SR, Poi WR, Sundefeld ML, *et al.* Healing process of incisor teeth of diabetic rats replanted after storage in milk. *Dent Traumatol* 2009;25(3):284-9.

Rios HF, Bonewald LF, Conway SJ. Lessons from the matricellular factor periostin. *J Dent Res* 2014;93(9):843-5.

Ritter AL, Ritter AV, Murrah V, Sigurdsson A, Trope M. Pulp revascularization of replanted immature dog teeth after treatment with minocycline and doxycycline assessed by laser Doppler flowmetry, radiography, and histology. *Dent Traumatol* 2004;20:75–84.

Robson F, Ramos-Jorge ML, Bendo CB, Vale MP, Paiva SM, Pordeus IA. Prevalence and determining factors of traumatic injuries to primary teeth in preschool children. *Dent Traumatol* 2009;25(1):118-22.

Rocha MJ, Cardoso M. Traumatized permanent teeth in Brazilian children assisted at the Federal University of Santa Catarina, Brazil. *Dent Traumatol* 2001;17(6):245-9.

Rodan GA, Martin TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption--a hypothesis. *Calcif Tissue Int* 1981;33(4):349-51.

Sae-Lim V, Wang CY, Choi GW, Trope M. The effect of systemic tetracycline on resorption of dried replanted dogs' teeth. *Endod Dent Traumatol* 1998;14(3):127-32.

Saito CT, Gulinelli JL, Panzarini SR, Garcia VG, Okamoto R, Okamoto T, *et al.* Effect of low-level laser therapy on the healing process after tooth replantation: a histomorphometrical and immunohistochemical analysis. *Dent Traumatol* 2011;27(1):30-9.

Santamaria M Jr, Fracalossi AC, Consolaro MF, Consolaro A. Influence of bisphosphonates on alveolar bone density: a histomorphometric analysis. *Braz Oral Res* 2010;24(3):309-15.

Santos SE, Marchiori EC, Soares AJ, Asprino L, de Souza Filho FJ, de Moraes M, *et al.* A 9-year retrospective study of dental trauma in Piracicaba and neighboring regions in the State of São Paulo, Brazil. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68(8):1826-32.

Scagliotti GV, Hirsh V, Siena S, Henry DH, Woll PJ, Manegold C, *et al.* Overall survival improvement in patients with lung cancer and bone metastases treated with denosumab versus zoledronic acid: subgroup analysis from a randomized phase 3 study. *J Thorac Oncol* 2012;7:1823–9.

Schour I; Massler M. The teeth. In: Farris, EJ; Griffith JK. *The rat in laboratory investigation*. 2.ed. New York, Hafner Publishing Co. 1967;104-65.

Selvig KA, Bjorvatn K, Bogle GC, Wikesjo UM. Effect of stannous fluoride and tetracycline on periodontal repair after delayed tooth replantation in dogs. *Scand J Dent Res* 1992;100:200–3.

Selvig KA, Bjorvatn K, Claffey N. Effect of stannous fluoride and tetracycline on repair after delayed replantation of rootplaned teeth in dogs. *Acta Odontol Scand* 1990;48:107–12.

Shulman LB, Gedalia I, Feingold RM. Fluoride concentration in root surfaces and alveolar bone of fluoride-immersed monkey incisors three weeks after replantation. *J Dent Res* 1973;52(6):1314-6.

Silva I, Branco JC. Denosumab: recent update in postmenopausal osteoporosis. *Acta Reumatol Port* 2012;37(4):302-313.

Silva RAB, Ferreira PDF, De Rossi A, Nelson-Filho P, Silva LAB. Silence of toll-like receptor 2 caused the formation of larger periapical lesions with greater number of osteoclasts in mice. *Journal of Endodontics* 2012;38(6):803-13.

Sodek J, Cheifitz S. Molecular regulation of osteogenesis. In: Davies JE, editor. *Bone engineering*. Toronto: Canada, 2000.

Sonoda CK, Poi WR, Okamoto T, Toyota E, Takeda RH. Mediate teeth reimplantation after root treatment with 1%, 2,5%, 5% and 10% sodium hypochlorite solution. *Rev Bras Odontol* 2000;57:293–6.

Soriano EP, Caldas Jr. AF, Góes PS. Risk factors related to traumatic dental injuries in Brazilian schoolchildren. *Dent Traumatol* 2004;20(5):246-50.

Sottovia AD, Sonoda CK, Poi WR, Panzarini SR, Lauris JRP. Delayed tooth replantation after root surface treatment with sodium hypochlorite and sodium fluoride: histomorphometric analysis in rats. *J Appl Oral Sci* 2006;14:93–9.

Sottovia AD, Sottovia Filho D, Poi WR, Panzarini SR, Luize DS, Sonoda CK. Tooth replantation after use of Euro-Collins solution or bovine milk as storage medium: a histomorphometric analysis in dogs. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68:111-119.

Sutjandra L, Rodriguez RD, Doshi S, Ma M, Peterson MC, Jang GR, *et al.* Population pharmacokinetic meta-analysis of denosumab in healthy subjects and postmenopausal women with osteopenia or osteoporosis. *Clin Pharmacokinet* 2011;50:793-807.

Tanaka S. Regulation of bone destruction in rheumatoid arthritis through RANKL-RANK pathways. *World J Orthop* 2013;4(1):1-6.

Tanaka T, Slavin J, McLachlan SA, Choong P. Anti-osteoclastic agent, denosumab, for a giant cell tumor of the bone with concurrent Paget's disease: A case report. *Oncol Lett* 2017;13(4):2105-2108.

Tello G, Bonini GC, Murakami C, Abanto J, Oliveira LB, Bönecker M. Trends in the prevalence of traumatic crown injuries and associated factors in Brazilian preschool children: 10-year observational data. *Dent Traumatol* 2016;32(4):274-80.

Thong YL, Messer HH, Zain RB, Saw LH, Yoong LT. Intracanal bisphosphonate does not inhibit replacement resorption associated with delayed replantation of monkey incisors. *Dent Traumatol* 2009; 25(4):386-93.

Traebert J, Bittencourt DD, Peres KG, Peres MA, de Lacerda JT, Marcenes W. Aetiology and rates of treatment of traumatic dental injuries among 12-year-old school children in a town in southern Brazil. *Dent Traumatol* 2006;22(4):173-8.

Traebert J, Peres MA, Blank V, Böell Rda S, Pietruza JA. Prevalence of traumatic dental injury and associated factors among 12-year-old school children in Florianópolis, Brazil. *Dent Traumatol* 2003;19(1):15-8.

Tronstad L. Root resorption - etiology, terminology and clinical manifestations. *Endod Dent Traumatol* 1988;4(6):241-52.

Trope M. Clinical management of the avulsed tooth: present strategies and future directions. *Dent Traumatol* 2002;18:1-11.

Trope M, Yesilsoy C, Koren L, Moshonov J, Friedman S. Effect of different endodontic treatment protocols on periodontal repair and root resorption of replanted dog teeth. *J Endod* 1992;18(10):492-6.

Tzigkounakis V, Merglová V, Hecová H, Netolický J. Retrospective clinical study of 90 avulsed permanent teeth in 58 children. *Dent Traumatol* 2008;24(6):598-602.

Vilela RG, Gjerde K, Frigo L, Leal Junior EC, Lopes-Martins RA, Kleine BM, *et al.* Histomorphometric analysis of inflammatory response and necrosis in re-implanted central incisor of rats treated with low-level laser therapy. *Lasers Med Sci* 2012;27(3):551-7.

Warshawsky H, Moore G. A technique for the fixation and descalcification of rat incisors for electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 1967;15(9):542-9.

Wei X, Pushalkar S, Estilo C, Wong C, Farooki A, Fornier M, *et al.* Molecular profiling of oral microbiota in jawbone samples of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Oral Dis* 2012;18(6):602-12.

Wiegand A, Attin T. Efficacy of enamel matrix derivatives (Emdogain) in treatment of replanted teeth--a systematic review based on animal studies. *Dent Traumatol* 2008; 24(5):498-502.

Yamada S, Tauchi T, Awata T, Maeda K, Kajikawa T, Yanagita M, *et al.* Characterization of a novel periodontal ligament-specific periostin isoform. *J Dent Res* 2014; 93(9):891-7.

Yanpiset K, Trope M. Pulp revascularization of replanted immature dog teeth after different treatment methods. *Endod Dent Traumatol* 2000;16:211–217.

Yoo JE, Kim MS, Kwon YD, Kim EC, Kim KC, Choi SC. Could zoledronic acid prevent root resorption in replanted rat molar? *Dent Traumatol* 2015; [Epub ahead of print].

Zaleckiene V, Peciuliene V, Brukiene V, Drukteinis S. Traumatic dental injuries: etiology, prevalence and possible outcomes. *Stomatologija* 2014;16(1):7-14.

Zanetta-Barbosa D, Moura CC, Machado JR, Crema VO, Lima CA, de Carvalho AC. Effect of indomethacin on surface treatment and intracanal dressing of replanted teeth in dogs. *J Oral Maxillofac Surg* 2014;72(1):127.

Zervas P, Lambrianidis T, Karabouta-Vulgaropoulou I. The effect of citric acid treatment on periodontal healing after replantation of permanent teeth. *Int Endod J* 1991;24:317–25.

Anexo

ANEXO - A

Aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Comissão de Ética no Uso de Animais

Of. CEUA 068/2014

Ribeirão Preto, 29 de agosto de 2014.

Ref. processo nº 2014.1.375.58.1

Senhor(a) Pesquisador(a),

Informamos que a Comissão de Ética no Uso de Animais, em sua 19ª Sessão, realizada em 29/08/2014, **aprovou** os procedimentos éticos apresentados no Protocolo sobre a Pesquisa intitulada: "Efeito do tratamento de superfície radicular com Denosumab previamente ao reimplante dental", emitindo o certificado anexo.

Informamos, também, que deverá ser entregue na Secretaria da CEUA, **até 03/08/2017**, o **Relatório Final** contendo os resultados e/ou resumo do trabalho publicado.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Andriara De Rossi Daldegan

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Ilmo(a). Sr(a).

Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da SilvaDepartamento de Clínica Infantil
desta Faculdade

./cfc

53399-38 00:57/2014 11:33