



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

LUIZA MONZOLI CÔVRE

**AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE BREU-BRANCO NO
PROCESSO DE REPARO DE INCISIVOS DE RATOS
REIMPLANTADOS**

Araçatuba
2022

LUIZA MONZOLI CÔVRE

**AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE BREU-BRANCO NO
PROCESSO DE REPARO DE INCISIVOS DE RATOS
REIMPLANTADOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, para obtenção do grau de “Doutora em Odontologia” - Área de concentração em Clínica Integrada.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Atili Brandini de Weert

Araçatuba
2022

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

C873a Côvre, Luiza Monzoli.
Avaliação da ingestão de breu-branco no processo de reparo de incisivos de ratos reimplantados / Luiza Monzoli Côvre. - Araçatuba, 2022
55 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Daniela Atili Brandini de Weert

1. Inflamação 2. Avulsão dentária 3. Traumatismos dentários 4. Reimplante dentário 5. Burseraceae
I. T.

Black D2
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

A minha família; aos meus pais, Luiz e Ângela e ao meu irmão André. Eles que são meus maiores incentivadores, minha base e minha fonte de força e de amor. Obrigada por tanto, essa conquista é nossa!

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, nas pessoas do Diretor Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara e do Vice-Diretor Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem por proporcionar a realização desta pesquisa.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia UNESP – Araçatuba, Prof. Dr. Wirley Gonçalves Assunção pelo acolhimento para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria de Pós-graduação, pela atenção, disponibilidade, paciência e simpatia concedida durante todas as etapas.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela prontidão em nos atender.

Aos funcionários do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Paulo, Renato e Marco. Muito obrigada por toda ajuda, atenção, disponibilidade e pelos bons papos durante os momentos de pausa para tomar um café.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal do Piauí, em nome da Profa. Dra. Mariana Helena Chaves, pela parceria realizada nesse estudo, nos fornecendo o material principal necessário para realização desse projeto.

A agência de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pelo auxílio financeiro de bolsa durante parte do período de desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do curso de pós-graduação, obrigada por todos os momentos compartilhados, vocês fizeram os meus dias muitos mais divertidos.

E a todos que de maneira direta ou indireta, contribuíram para meu crescimento e à realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus,

Protetor, guia e refúgio, consigo sentir sua presença sempre comigo em todo o decorrer da minha vida, guiando minhas escolhas e iluminando meus caminhos. Nos momentos de fraqueza e aflição, Ele sempre me deu forças para continuar e mostrou seu amor incondicional para conosco. Sem o Senhor, meu Deus, nada disso seria possível.

A minha família,

Meus pais, Angela Maria Monzoli Côvre e Luiz Antônio Côvre e meu irmão, André Monzoli Côvre, eles que representam para mim o amor mais puro e verdadeiro, são meus maiores exemplos de vida. Foi observando meus pais que aprendi a lutar, a ter força, determinação, responsabilidade e a nunca perder a esperança frente aos momentos difíceis. Sempre se esforçaram ao máximo, para que eu e meu irmão pudéssemos ter uma educação de qualidade, enquanto poucos acreditavam que um dia chegaríamos tão longe. Eram poucas chances e oportunidades para dois jovens que moravam na roça e no interior, mas vocês nunca desistiram e nunca nos deixaram desistir. Obrigada por sempre acreditarem em mim, mesmo quando eu não acreditava. Tenho muito orgulho de toda nossa história. Hoje quase 2000 km de distância nos separam fisicamente, mas o amor é maior, vocês se fazem presentes em meu coração, pensamento e nas ligações por vídeo-chamada, obrigada tecnologia! A saudade é muito grande, obrigada por entenderem minha ausência física e obrigada por sempre se fazerem presentes, mesmo distantes. Toda ida para casa é uma alegria, mas na volta o coração fica apertado, eu volto, mas parte de mim sempre fica com vocês. Obrigada por tudo, todas as minhas conquistas são também suas, e se hoje mais essa se concretiza, ela se deve inteiramente a vocês. Espero que algum dia eu possa retribuir todo carinho, cuidado e sacrifícios que vocês fizeram para que eu conseguisse alcançar meus sonhos. Amo vocês!

Ao meu namorado,

Luiz Henrique Soares Torres, sinônimo de amor, companheirismo e parceria. Há seis anos compartilhamos a vida juntos e eu amo dividi-la com você. Esteve presente desde o início, quando ingressar na vida acadêmica ainda era apenas uma ideia distante e agora estamos aqui prestes a alcançar mais esse degrau importante. A distância nunca foi empecilho para nós, seja bairro diferentes, cidades, estados ou continentes, nunca deixamos que esse fator interferisse entre a gente, a presença é sentida do mesmo jeito, o apoio e o amor são os mesmos. Acompanhou todos os momentos vividos nesta etapa, me deu apoio quando estive triste, foi psicólogo, conselheiro e vibrou junto comigo as vitórias e conquistas. Obrigada pela paciência quando as coisas estavam difíceis e não podia dar atenção devida ou quando eu tinha minhas oscilações de humor e crises existenciais. Obrigada por sempre me ouvir e incentivar a correr atrás dos meus sonhos e objetivos. Você é incrível, que bom que tenho você comigo, é maravilhoso poder compartilhar a vida com você e podermos crescer juntos. “Vou dividir a minha única vida com você.” Amo você, meu bem!

Aos amigos,

Lais Sara Egas, meu melhor presente da FOA, ganhei uma amiga para a vida. Virou minha companheira para todos os momentos em Araçatuba, aquela que eu sei que posso contar sempre. Obrigada por todo apoio, ajuda, incentivo, amizade e por tantos momentos compartilhados. Você é uma pessoa linda por dentro e por fora, iluminada, que espalha alegria por onde passa. Lai, você merece tudo de mais maravilhoso nessa vida. Obrigada por tudo.

Ana Paula Veloso de Linhares, Bruno Eduardo Garcia Gimeno e Joyce Terassaka Dias, juntos formamos os “Alpes”, que felicidade foi encontrar vocês na minha vida, cada um foi chegando para apenas dividir as contas em um apartamento e quando vi já estavam dividindo espaço em meu coração. Criamos laços de amizade que tenho certeza que se estenderão para a vida, não importa o caminho e a distância que estivermos um dos outros. Quando nos reunimos é como recarregar as baterias, sempre cheio de boas conversas, risadas sinceras e sentimento puro e verdadeiro. Que bom que nos encontramos!

Ana Laura Albuquerque, Caio Vinicius Debortoli, Leonardo Raniel Figueiredo, Lourenço Tereza Canevari, Marina Fuzette Amaral e Vitor Hugo Sampaio, amigos que a Clínica integrada e o “Bradini’s team” me proporcionaram, vocês foram essenciais para que essa etapa se concretizasse. Foram tantos momentos compartilhados com vocês, tantas risadas, nervosos, perrengues e responsabilidades, mas juntos conseguimos vencer cada etapa. Um grupo desses não é em todo lugar que a gente encontra, em que há apoio, parceria e amizade, um sempre apoiando o outro. Obrigada por tanto.

A minha orientadora,

Daniela Atili Brandini de Weert, um exemplo de pessoa, profissional e força de vontade. Dona de um coração enorme e um sorriso contagiante. Me recebeu de braços abertos e me fez sentir acolhida desde o começo. Sem dúvidas ter você como minha orientadora foi um presente. Pude aprender tanto, aprender a odontologia da melhor forma, aprender a ser docente, a ser pesquisadora e ainda aprendizados que extrapolaram o âmbito acadêmico e profissional. Obrigada por depositar sua confiança, acreditar em mim e incentivar a sempre buscar o meu melhor. Me inspiro muito em você, que alegria e que honra foi ter sido sua orientada. Lembrarei sempre com muito carinho desta etapa. Não sei onde os caminhos da vida me levarão, mas quero poder estar sempre presente e você estar sempre presente em minha vida. Muito obrigada por tudo professora!

Aos professores da Clínica Integrada,

Celso Koogi Sonoda, pessoa e profissional maravilhoso. Agradeço por me acolher tão bem desde o momento em que fui a FOA pela primeira vez, ainda para fazer o processo seletivo para o mestrado. Obrigada por todo conhecimento e ensinamento ao longo desses anos. Você é um exemplo de professor que admiro muito e levarei para a toda minha carreira.

Aline Satie Takamiya, mais do que uma professora, virou parceira e amiga, é uma pessoa que é exemplo de determinação e responsabilidade, sempre

solicita e pronta para ajudar quando precisei, obrigada pela parceria, boas conversas, caronas e todo carinho ao longo desses anos.

“Bom mesmo é ser um realista esperançoso.”

Ariano Suassuna

Côvre LM. Avaliação da ingestão de breu-branco no processo de reparo de incisivos de ratos reimplantados [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2022.

RESUMO

Objetivo: Avaliação histológica da influência da administração sistêmica de solução de Breu-branco, sob o reparo periodontal e pulpar de incisivos de ratos submetidos a reimplante dentário. **Material e método:** O composto testado foi obtido a partir do fracionamento da resina de *P. heptaphyllum* (Breu-branco) em coluna cromatográfica e diluído em solução de tween 80. A avulsão foi induzida no incisivo central superior direito de 33 ratos Wistar machos, divididos em três grupos: RI (Reimplante imediato), em que os dentes foram mantidos em meio seco e reimplantados com 5 minutos, RTLI (Reimplante tardio conservado em leite integral), dentes mantidos 60 minutos em leite integral, reimplantados e após os animais foram tratados por 5 dias com soro fisiológico por gavagem, e RTLI+BB (Reimplante tardio conservado em leite integral com administração de solução de breu-branco), os dentes permaneceram 60 minutos em leite integral, reimplantados e os animais foram tratados por 5 dias com breu-branco sistemicamente por gavagem. Após 60 dias foi realizada eutanásia por sobredosagem anestésica e coletada a hemi-maxila direita contendo o incisivo reimplantado. Os cortes histológicos transversais foram corados com hematoxilina-eosina para avaliação histológica em microscopia de luz. Na análise histomorfométrica foram analisadas as características do ligamento periodontal, osso alveolar, cemento, dentina e polpa. Os testes Kruskal-Wallis e post-hoc de Dunn foram utilizados para a comparação entre os grupos. **Resultados:** Os três grupos no geral apresentaram resultados semelhantes na maioria das variáveis analisadas, somente o grupo RTLI apresentou diferença estatística significativa menor na organização do ligamento periodontal e inflamação aguda em comparação com o grupo controle. **Conclusão:** A solução de breu-branco apresentou potencial para utilização como medicação sistêmica em casos de reimplante dentário tardio, por mostrar comportamento semelhante ao reimplante imediato no processo de reparo do ligamento periodontal e pulpar.

Palavras-chave: Inflamação. Avulsão dentária. Traumatismos dentários. Reimplante dentário. Burseraceae.

Côvre LM. Evaluation of breu-branco ingestion in the repair process of reimplanted rat incisors [tese] – Araçatuba: São Paulo State University (Unesp); 2022.

ABSTRACT

Objective: Histological evaluation of the influence of systemic administration of Breu-branco solution on periodontal and pulpal repair of incisors of rats submitted to dental reimplantation. **Material and method:** The compound tested was obtained from the fractionation of *P. heptaphyllum* resin (Breu-branco) in a chromatographic column and diluted in a tween 80 solution. The avulsion was induced in the upper right central incisor of 33 male Wistar rats, divided into three groups: IR (Immediate replantation), in which the teeth were kept in a dry medium and reimplanted after 5 minutes, RTLI (Delayed replantation preserved in whole milk), teeth kept 60 minutes in whole milk, reimplanted and after that the animals were treated for 5 days with saline solution by gavage, and RTLI+BB (Delayed replantation preserved in whole milk with administration of breu-branco solution), the teeth remained 60 minutes in whole milk, reimplanted and the animals were treated for 5 days with breu-branco systemically by gavage. After 60 days, euthanasia was performed by anesthetic overdose and the right hemi-maxilla containing the reimplanted incisor was collected. Cross-sectional histological sections were stained with hematoxylin-eosin for histological evaluation in light microscopy. In the histomorphometric analysis, the characteristics of the periodontal ligament, alveolar bone, cementum, dentin and pulp were analyzed. Kruskal-Wallis and Dunn's post-hoc tests were used for comparison between groups. **Results:** The three groups in general showed similar results in most of the variables analyzed, only the RTLI group showed a statistically significant lower difference in the organization of the periodontal ligament and acute inflammation compared to the control group. **Conclusion:** The breu-branco solution showed potential for use as a systemic medication in cases of late dental replantation, as it behaves similarly to immediate replantation in the repair process of the periodontal ligament and pulp.

Keywords: Inflammation. Tooth avulsion. Dental trauma. Tooth replantation. *Burseraceae*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição dos escores e análise estatística dos eventos histomorfológicos da organização e inflamação aguda e crônica do ligamento periodontal (Teste post-hoc de Dunn para cada variável ordinal com 5% de nível de significância)	34
Tabela 2 -	Distribuição dos escores e análise estatística dos eventos histomorfológicos na raiz dentária (Teste post-hoc de Dunn para cada variável ordinal com 5% de nível de significância)	36
Tabela 3 -	Distribuição dos escores e análise estatística dos eventos histomorfológicos no osso alveolar (Teste post-hoc de Dunn para cada variável ordinal com 5% de nível de significância)	38
Tabela 4 -	Distribuição dos escores e análise estatística dos eventos histomorfológicos no tecido pulpar (Teste post-hoc de Dunn para cada variável ordinal com 5% de nível de significância)	39

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Distribuição da mediana dos escores em cada grupo para os 35 eventos histomorfológicos da organização e inflamação aguda e crônica do ligamento periodontal (Teste post-hoc de Dunn para cada variável ordinal com 5% de nível de significância). A: Organização do ligamento periodontal. B: Intensidade do processo inflamatório agudo. C: Extensão do processo inflamatório agudo. D: Intensidade do processo inflamatório crônico. E: Extensão do processo inflamatório crônico
- Figura 2 - Distribuição da mediana dos escores em cada grupo para os 37 eventos histomorfológicos da raiz dentária (Teste post-hoc de Dunn para cada variável ordinal com 5% de nível de significância). A: Reabsorção dentária ativa ou inativa. B: Extensão da reabsorção dentária. C: Profundidade da reabsorção dentária. D: Reparo das áreas de reabsorção dentária
- Figura 3 - Distribuição da mediana dos escores em cada grupo para os 38 eventos histomorfológicos do osso alveolar (Teste post-hoc de Dunn para cada variável ordinal com 5% de nível de significância). A: Reabsorção do tecido ósseo adjacente. B: Áreas de anquilose na raiz dentária
- Figura 4 - Distribuição da mediana dos escores em cada grupo para os 39 eventos histomorfológicos da vitalidade do tecido pulpar (Teste post-hoc de Dunn para cada variável ordinal com 5% de nível de significância). A: Tecido pulpar
- Figura 5 - Cortes longitudinais da superfície radicular da face palatina do 40 Incisivo central superior direito, corados em Hematoxilina e Eosina, sob microscopia de luz
- Figura 6 - Cortes longitudinais do tecido pulpar do Incisivo central superior 41 direito, corados em Hematoxilina e Eosina, sob microscopia de luz

LISTA DE ABREVIATURAS

BB	Breu-branco
C	Carbono
CCD	Cromatografia de camada delgada
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
G	Gramas
H	Hidrogênio
H.E.	Técnica de coloração das lâminas com hematoxilina e eosina
HE	Hematoxilina-eosina
I.M.	Intra Muscular
ICSD	Incisivo central superior direito
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
LP	Ligamento Periodontal
mg/Kg	Miligramas por quilo
mL	Mililitros
mm	Milímetro
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
OPG	Osteoprotegerina
PBS	Tampão fosfato de sódio
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
pH	Potencial Hidrogeniônico
RANK	Ativador do receptor do fator nuclear Kappa-Beta
RANK-L	Ligante do receptor do ativador do fator nuclear Kappa-Beta
RI	Reimplante imediato
RMN	Ressonância magnética nuclear
RTLI	Reimplante tardio conservado em leite integral
RTLI+BB	Reimplante tardio conservado em leite integral com administração de breu-branco
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
USA	United States of America
μ m	Micrometro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 PROPOSIÇÃO	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Síntese e caracterização do pó de breu-branco	22
3.2 Identificação do pó de breu-branco	22
3.3 Experimento in vivo: Reimplante dentário em ratos	22
3.3.1 Animais	23
3.3.2 Anestesia dos animais	23
3.3.3 Indução da Avulsão dentária	23
3.3.4 Indução do Reimplante	24
3.3.5 Preparo da solução da resina de <i>P. heptaphyllum</i> para administração via oral nos animais	24
3.3.6 Grupos Experimentais e tratamento com breu-branco	24
3.3.7 Eutanásia e processamento histológico	25
3.3.8 Coloração Hematoxilina e Eosina	25
3.4 Análise histológica qualitativa e quantitativa	26
3.4.1 Análise quantitativa das ocorrências histomorfológicas	26
3.5 Análise estatística	30
4 RESULTADOS	32
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	50
ANEXOS	55

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O trauma dentário pode ser definido como uma lesão proveniente de um impacto externo sobre os dentes e/ou outros tecidos no interior e ao redor da cavidade oral.^{1,2} A maior prevalência de trauma dentário na população mundial envolve crianças e adolescentes, no entanto, embora essas lesões sejam mais comuns nesses determinados grupos, todos os indivíduos estão susceptíveis a uma lesão por trauma dentário, devido a suas atividades comuns diárias, assim como o aumento dos níveis de violência e do número de acidentes de trânsito, tudo isso contribuindo para que o trauma dentário se torne um problema de saúde pública emergente.^{1,3}

A avulsão é considerada o tipo de trauma mais grave no grupo de traumatismos dentário, ocorre quando há o completo deslocamento do dente para fora de seu alvéolo, caracterizado pelo rompimento do feixe vaso-nervoso e das fibras do ligamento periodontal.^{4,5} O reimplante é considerado o melhor tipo de tratamento para o dente avulsionado, mesmo que as condições não sejam favoráveis.⁵ A patologia dentro do reimplante envolve tanto reações pulpares quanto periodontais, a polpa e o ligamento periodontal sofrem grandes danos quando o tempo extra-alveolar é muito grande, sendo as reações de cura dependentes em maior parte desse tempo, do manuseio do dente, grau de formação radicular e emprego ou não de um meio de conservação adequado.⁶

Desse modo, o reimplante imediato é a melhor alternativa para os casos de avulsão dentária, devido ao tempo que esse dente permaneceu fora do alvéolo, o qual é crítico para a sobrevivência das células do ligamento periodontal, uma vez que quando se consegue manter a viabilidade celular, permite-se uma maior probabilidade de reinserção das fibras e preservação do dente.⁷⁻¹⁰

No reimplante, controlar a inflamação durante o reparo periodontal é de extrema importância, uma vez que a persistência da inflamação aguda ou crônica durante um grande período estabelece um ambiente que estimula e favorece a ocorrência da reabsorção radicular.^{9,10}

Atualmente, o mercado farmacêutico tem demonstrado grande interesse para pesquisas empregando plantas medicinais, sobretudo a aquelas utilizadas pela população, desse modo dando lugar ao desenvolvimento de novas drogas. O Brasil é um país com grande diversidade vegetal, portanto possuindo um enorme potencial

para o desenvolvimento de medicamentos que aliem o conhecimento tradicional vinculado às plantas fitoterápicas e a tecnologia, possibilitando ampliar os benefícios gerados com essa substância.¹¹

A resina obtida da árvore *Protium heptaphyllum*, conhecida popularmente como breu-branco (BB), é bastante utilizada na medicina popular e vêm sendo estudada nas áreas de farmacologia, medicina e odontologia, devido a suas propriedades anti-inflamatória, analgésica, antiplaquetária, antinoceptiva, em cicatrização de feridas, efeitos hipoglicemiantes e hipolipemiantes, atividade anticonvulsivante, efeitos ansiolíticos e antidepressivos.¹²⁻²³

A árvore *Protium heptaphyllum*, pertence à família Burseraceae, também conhecida popularmente por “almecega” e “breu-branco”, é encontrada na região da América do Sul, principalmente na região Amazônica, Piauí, Bahia, Minas Gerais, Goiás, e em países como Suriname, Colômbia, Venezuela e Paraguai. A obtenção da substância é realizada a partir de incisões feitas no tronco da árvore, em que se obtém um óleo-resina aromático, que em contato com o ar se solidifica. É importante ressaltar que o processo de obtenção da resina não causa nenhum tipo de dano à árvore.²⁴ Essa resina oleosa exsudada é rica em uma mistura de triterpenos, identificados como α -amirina, β -amirina, breína, maniladiol, α -amirona, β -amirona e lupenona, além de um óleo essencial rico em mono e sesquiterpenos.^{24,25}

Os triterpenos tem chamado atenção nos últimos anos devido as suas atividades terapêuticas. Na resina extraída da *P. heptaphyllum* a maior concentração de triterpenos está na forma de α -amirina e β -amirina, triterpenos pentacíclicos considerados o seu principal componente e principal responsável pelas propriedades terapêuticas citadas acima, principalmente a anti-inflamatória,¹² propriedade importante para o reimplante dentário.

Desse modo, diante do exposto, o estudo da resina de *P. heptaphyllum* e seus principais componentes, como sua propriedade anti-inflamatória, tornam-se relevante sobre sua influência no processo de reparo periodontal de dentes reimplantados.

Proposição

2 PROPOSIÇÃO

Objetivo geral:

Avaliar a influência da utilização sistêmica da breu-branco sobre o processo de reparo periodontal de incisivos centrais de ratos reimplantados.

Objetivo específico:

Análise histológica qualitativa e quantitativa do processo de reparo periodontal e pulpar de dentes submetidos ao reimplante, em ratos que receberam a administração sistêmica de solução com breu-branco.

Materiais e métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Síntese e caracterização do pó de breu-branco

Uma amostra da espécie vegetal *P. heptaphyllum* depositada no Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí, exsicata TEPB 18247 que possui cultivo controlado/padronizado foi utilizada. O exsudato resinoso do tronco de *P. heptaphyllum* foi coletado no município de Timon, Maranhão, Brasil, posteriormente à sua identificação pela botânica Profa. Titular Roseli Farias de Melo Barros do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Piauí. O pó de breu-branco foi obtido a partir do fracionamento da resina de almecega (*P. heptaphyllum*) em coluna cromatográfica, como descrito anteriormente por Vieira Júnior et al.²⁴

3.2 Identificação do pó de breu-branco

A resina bruta (410 g) foi dissolvida em metanol/diclorometano (Sigma Aldrich, St Louis, Missouri, USA) (4:1), filtrada e o solvente evaporado num evaporador rotativo para obtenção de 408 g (99,5%) de resina branca amorfa. A análise fitoquímica da resina revelou a presença de triterpenóides pentacíclicos (56%), os quais foram identificados por RMN de ¹H e ¹³C e espectroscopia de massa. Foi encontrado 5,4 g (45,3%) de α -amirina e β -amirina, sendo que 28,3% (3,4 g) da resina correspondeu à α -amirina e 16,6% (2,0 g) à β -amirina. Também estão presentes a breína e maniladol (9,5%) e uma pequena quantidade (1,25%) de uma mistura de lupeona, α -amiriona e β -amirinona. A identidade estrutural de α - e β -Amirina foi confirmada por análise espectral de RMN ¹H e ¹³C.²⁴

3.3 Experimento *in vivo*: Reimplante dentário em ratos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, sob número de processo FOA 00607-2020 (ANEXO A).

3.3.1 Animais

Foram utilizados 33 ratos Wistar machos, estabelecidos através de cálculo amostral, em que para um poder de teste de 80%, com nível de significância de 0,05, com a diferença da média de 0,854 e desvio padrão de 0,563, ficou estabelecido um número de 11 animais por grupo. Os animais possuíam peso corporal variando entre 200 – 300 g, obtidos junto ao Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Os ratos foram acomodados em gaiolas com cinco animais cada, a uma temperatura ambiente de 22 ± 2 °C, 50 ± 10 % de umidade relativa do ar e com ciclos de claro/escuro de 12/12 horas. Os animais receberam água *ad libitum* e ração granulada durante todo o experimento, exceto 12 horas antes da cirurgia, em que os mesmos permaneceram em jejum.

3.3.2 Anestesia dos animais

Previamente à execução dos procedimentos experimentais os animais receberam como relaxante muscular a xilazina (10 mg/kg, Coopazine; Coopers, São Paulo, Brasil) e para a anestesia o cloridrato de quetamina (70 mg/kg, Vetanarcol; Laboratórios König, Buenos Aires, Argentina); ambas as drogas administradas por via intramuscular (I.M.). Após serem anestesiados, os animais foram posicionados na mesa operatória em decúbito dorsal, tendo os membros caudais e craniais imobilizadas de maneira que a cabeça do animal fique estável e a boca aberta por meio de anéis posicionados nos incisivos superiores e inferiores.

3.3.3 Indução da Avulsão dentária

Realizada a antissepsia da porção anterior da maxila com polivinilpirrolidona-iodo (Riodeine – Ind Farmac. Rioquímica Ltda), sindesmotomia, luxação e extração do incisivo superior direito (ICSD) com auxílio de instrumental especialmente adaptado.

Nos dentes extraídos, a papila dentária e o órgão do esmalte foram seccionados com lâmina de bisturi nº15 (EMBRAMAC Exp. E Imp). Os dentes foram armazenados em meio de conservação, com duração de acordo com a divisão dos grupos experimentais abaixo.

3.3.4 Indução do Reimplante

Após armazenamento, os dentes extraídos de todos os grupos foram reimplantados em seus respectivos alvéolos, com preparo prévio do mesmo. Nenhuma contenção foi realizada. Os animais foram acompanhados até se recuperarem da anestesia antes de retornarem ao biotério.

Após o reimplante, os animais dos grupos RI e RTLI receberam uma única dose intramuscular de 20.000 UI de penicilina G benzatina (Fontoura Wyeth S.A., São Paulo - Brasil). Os animais do grupo RTLI+BB não receberam nenhum tipo de antibioticoterapia sistêmica.

3.3.5 Preparo da solução da resina de *P. heptaphyllum* para administração via oral nos animais

Um total de 6g da mistura da extraída resina de *P. heptaphyllum* na forma de pó, foi diluída em solução de 3% de Tween 80 em água destilada, chegando a uma solução com concentração da mistura de breu-branco de 10% (Aphoticário farmácia de manipulação, Araçatuba, São Paulo - Brasil).

3.3.6 Grupos Experimentais e tratamento com breu-branco

Para o tratamento sistêmico, foi administrada em dose única (1mL) diariamente por gavagem, solução da resina de *P. heptaphyllum* (*Breu-branco*). O tratamento dos animais foi realizado durante 5 dias.

Os 33 animais foram divididos em 3 grupos experimentais, com período de observação de 60 dias:

- **Grupo RI – Reimplante imediato:** Dentes extraídos e armazenados em meio seco durante 5 minutos e depois reimplantados. Sem administração de medicação sistêmica.
- **Grupo RTLI – Reimplante tardio com Leite integral:** Dentes extraídos e armazenados em 1 mL de leite integral por 60 minutos e reimplantados. Com administração diária de solução de soro fisiológico por gavagem durante 5 dias.

- **Grupo RTLI+BB – Reimplante tardio com Leite integral e gavagem da solução de breu-branco (BB):** Dentes extraídos e armazenados em 1 mL de leite integral por 60 minutos e reimplantados, com administração diária da solução de breu-branco por gavagem durante 5 dias.

3.3.7 Eutanásia e processamento histológico

Após 60 dias a eutanásia dos animais ocorreu por meio de sobredosagem anestésica. A maxila direita foi separada da esquerda na linha mediana com o emprego de uma lâmina de bisturi nº 15 (Embramac Exp. E Imp.). Um corte com tesoura reta na porção distal do 3º molar possibilitou a obtenção da área da maxila contendo o dente avaliado com o trauma. As maxilas foram imediatamente dissecadas e colocadas em solução fixadora por 24 horas. A descalcificação das maxilas foi realizada por meio EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético) a 10% (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) em PBS. As peças anatômicas dissecadas, após descalcificação, passaram por desidratação em soluções de álcoois em concentrações crescentes, diafanizadas em soluções de xilol, com, e seguidamente impregnadas em parafina de baixa fusão (56-58 °C) com três trocas de parafina, de uma hora cada. Ao final, foram alocadas em blocos de madeira para adaptação em micrótomo (Leica – Aristoplan, Alemanha), onde foram coletados os cortes histológicos do ICSD com 4 µm de espessura no sentido transversal, após para adaptação na lâmina histológica, foram colocados em banho-maria (40-50 °C) e recolhidos nas lâminas revestidas de poli-L-lisina, sendo dois cortes por lâmina com diferença de 40 µm entre eles. Os cortes histológicos foram utilizados para a coloração no método de Hematoxilina-eosina (HE).

3.3.8 Coloração Hematoxilina e Eosina

Após a obtenção dos cortes, a parafina foi eliminada através do processo de desparafinização com xilol (em três banhos de xilol por 5, 10 e 15 minutos cada); hidratação com sequências decrescentes de álcool 90%, 70%, 50% e lavagem em tampão fosfato (PBS) 0,1 M, pH 7,4 (cada lavagem com duração de 10 minutos). As lâminas foram então imersas em solução de hematoxilina durante 3 minutos e lavadas com água corrente. Em seguida, imersas em eosina por 25 segundos e lavadas em água destilada. Posteriormente, após a secagem a temperatura

ambiente, as lâminas foram montadas com meio de montagem (Entellan, Merckmillipore, HE, Alemanha) e lamínula de vidro.

3.4 Análise histológica qualitativa e quantitativa

Os cortes histológicos foram analisados em campo claro com o auxílio de um microscópio óptico comum (Leica - Aristoplan, Alemanha) acoplado a uma câmera digital AxioCam MRc (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Alemanha). Os campos visuais das estruturas analisadas de cada animal foram coletados com objetivas de 2.5x, 20x e 40x utilizando o software Axiovision Rel 4.0 (Carl Zeiss, GmbH, Alemanha), alterando as variáveis de brilho e contraste de modo a realçar as células e tecidos.

Para coleta de dados quantitativos, as imagens foram processadas e quantificadas no programa de análise de imagens Image J (National Institutes of Health, EUA).

Somente a face palatina da raiz foi considerada, já que o dente de rato só apresenta ligamento periodontal nesta face. Analisadas as características do ligamento periodontal, osso alveolar, cemento e dentina, além da resposta inflamatória.

O examinador não soube a que grupo que pertence às imagens, a fim de evitar um viés na análise.

3.4.1 Análise quantitativa das ocorrências histomorfológicas

Para a quantificação das ocorrências histomorfológicas foram atribuídos escores de 1 a 4 aos diferentes eventos abaixo listados, onde 1 corresponde ao melhor resultado e 4 ao pior, ocupando os escores 2 e 3 posições intermediárias.^{26,27}

Eventos considerados para a análise dos resultados:

A. Ligamento Periodontal:

A.1. Organização do ligamento periodontal:

- 1- Fibras periodontais inseridas no osso e cimento em toda a extensão do ligamento;
- 2- Fibras periodontais inseridas no osso e cimento em dois terços da extensão do ligamento;
- 3- Fibras periodontais inseridas no osso e cimento em um terço da extensão do ligamento;
- 4- Ausência de fibras periodontais com inserção em osso e cimento.

A.2. Intensidade e extensão do processo inflamatório agudo e crônico do ligamento periodontal:

A.2.1. Intensidade do processo inflamatório:

- 1- Ausência ou presença ocasional de células inflamatórias;
- 2- Pequeno número de células inflamatórias. Até 10 células por campo com aumento de 400X;
- 3- Moderado número de células inflamatórias. De 11 a 50 células por campo com aumento de 400X;
- 4- Grande número de células inflamatórias. Acima de 50 células inflamatórias por campo com aumento de 400X.

A.2.2. Extensão do processo inflamatório:

- 1 - Ausência ou presença ocasional de células inflamatórias;
- 2 - Processo inflamatório presente apenas no ligamento periodontal apical ou coronário ou pequena área lateral;
- 3 - Processo inflamatório atingindo mais que a metade do ligamento periodontal lateral da raiz do dente;
- 4 - Processo inflamatório em todo ligamento periodontal.

B. Raiz do dente:

D.1. Reabsorção radicular ativa e inativa:

- 1 - Ausência de reabsorção radicular e ou reabsorções reparadas;
- 2 - Áreas de reabsorção inativa (ausência de células clásticas);
- 3 - Pequenas áreas de reabsorções ativas;
- 4 - Extensas áreas de reabsorção ativa.

B.2. Extensão da reabsorção radicular. Em lâminas representativas foram feitas medidas (em micrometros) da extensão das áreas de reabsorção. A medida dos valores obtidos por palatina permitirá a atribuição dos seguintes escores:

- 1- Ausência de reabsorção;
- 2- Extensão média de 1 a 1000 μm ;
- 3- Extensão média de 1001 a 5000 μm ;
- 4- Extensão média maior que 5001 μm .

B.3. Profundidade de reabsorção radicular. Em lâminas representativas foram feitas medidas (em micrometros) das maiores profundidades das áreas de reabsorção. A medida dos valores obtidos permitiu a atribuição dos seguintes escores:

- 1- Ausência de reabsorção;
- 2- Profundidade média de 1 a 100 μm ;
- 3- Profundidade média de 101 a 200 μm ;
- 4- Profundidade média maior que 201 μm .

B.4. Reparo nas áreas de reabsorção radicular:

- 1- Ausência de reabsorção ou deposição de cimento neoformado em toda extensão das áreas reabsorvidas;

- 2 - Deposição de cimento neoformado em metade ou mais da extensão das áreas reabsorvidas;
- 3- Deposição de cimento neoformado em menos da metade das áreas reabsorvidas;
- 4- Ausência de deposição de cimento neoformado junto às áreas reabsorvidas.

C. Tecido ósseo:

C.1. Áreas de reabsorção ativa e inativa:

- 1- Ausência de área de reabsorção;
- 2- Presença de área de reabsorção inativa-ausência de células clásticas;
- 3- Presença de pequenas áreas de reabsorção ativa;
- 4- Presença de extensas áreas de reabsorção ativa.

D. Anquilose:

- 1- Ausência de anquilose;
- 2- Pequenos pontos de anquilose;
- 3- Um terço da raiz está anquilosada;
- 4- Mais de um terço da raiz está anquilosada.

E. Polpa:

- 1- Normal;
- 2- Presença de calcificações;
- 3- Degenerada;
- 4- Necrosada.

3.5 Análise estatística

Após a coleta de dados, os dados foram tabulados e submetidos à análise estatística no programa estatístico GraphPad Prism 7.0. Foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk para testar a normalidade da amostra, sendo o resultado negativo. Desse modo, as diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com teste post-hoc de Dunn, com 5% de nível de significância.

Resultados

4 RESULTADOS

Grupo RI:

Na análise do ligamento periodontal, houve reinserção das fibras colágenas em todos dentes analisados, o mesmo apresentou-se bem organizado com suas fibras inseridas no osso e cimento, em toda a extensão do ligamento na maioria dos espécimes (6/11) e no restante em dois terços da extensão do ligamento (5/11) (Tabela 1; Figura 1; Figura 5. A-B). O ligamento periodontal apresentou-se com presença ocasional de processo inflamatório tanto agudo quanto crônico em grande parte dos espécimes (Tabela 1; Figura 1). Quanto as áreas de reabsorção dentária, alguns apresentaram ausência de reabsorção radicular (2/11), mas foram encontradas pequenas áreas de reabsorção inativa, com ausência de células clásticas (5/11), assim como áreas ativas (4/11), mas com pequena extensão e profundidade na maioria dos casos (9/11) (Tabela 2; Figura 2; Figura 5.C). Não houveram áreas de reabsorção do tecido ósseo adjacente em quase todos os espécimes (10/11) e nenhuma área de anquilose foi encontrada (11/11) (Tabela 3; Figura 3). Houve revascularização pulpar em mais da metade dos incisivos (6/11), com presença de calcificação e infiltrado inflamatório no terço apical em alguns espécimes (Tabela 4; Figura 4; Figura 6.A).

Grupo RTLI:

O espaço do ligamento periodontal apresentou-se bem organizado com suas fibras inseridas no osso e cimento, com maior parte dos espécimes apresentando reinserção em dois terços da extensão do ligamento (7/11) (Tabela 1; Figura 1; Figuras 5.D-E). O ligamento periodontal apresentou-se com pequeno infiltrado inflamatório agudo e crônico em toda a sua extensão, apresentando pequena extensão da área contendo células inflamatórias (Tabela 1; Figura 1). O cimento e a dentina apresentaram áreas de reabsorção inativa na maior parte dos dentes (9/11), com pequena profundidade de reabsorção. O reparo das áreas com deposição de cimento neoformado ocorreu em metade ou mais da extensão das áreas reabsorvidas na maior parte dos espécimes (7/11). Áreas com reabsorção inflamatória foram encontradas em algumas porções da raiz (Tabela 2; Figura 2; Figura 5.F). Pequenas áreas de anquilose foram observadas em 1/3 da raiz dentária

(5/9) (Tabela 3; Figura 3). O tecido pulpar se apresentou necrosado em quase metade dos espécimes (5/11), com alguns apresentando revascularização (3/11) e áreas de calcificação (2/11) (Tabela 4; Gráfico 4; Figura 6.B).

Grupo RTLI+BB:

Em todos os incisivos, houve reinserção das fibras do ligamento periodontal, este apresentou-se organizado com suas fibras inseridas no osso e cimento em toda extensão do ligamento em metade dos espécimes (5/10), em outros houve reinserção em dois terços da extensão do ligamento (3/10) e em menor quantidade em um terço da extensão (2/10) (Tabela 1; Figura 1; Figura 5. G-H). Observou-se pequeno número de células inflamatórias agudas no ligamento periodontal, com extensão se restringindo apenas no ligamento periodontal apical ou coronário e pequena área lateral (Tabela 1; Figura 1), no processo inflamatório crônico, apenas alguns espécimes apresentaram pequeno número de células inflamatórias (3/10). Foi encontrada pequenas áreas de reabsorção inativas no cimento e dentina (7/10), com pequena extensão e profundidade em sua maioria (8/10) e presença de cimento neoformado em metade ou mais da extensão das áreas reabsorvidas (8/10) (Tabela 2; Figura 2). Algumas áreas de reabsorção óssea inativas foram encontradas (3/10), assim como pequenos pontos de anquilose (2/10) e reabsorção por substituição (1/10) (Tabela 3; Figura 3; Figura 5.I). Ocorreu revascularização pulpar em mais da metade dos espécimes (6/10), com espécimes apresentando áreas de calcificação pulpar no terço médio, infiltrado inflamatório no terço apical e os outros com degeneração e necrose pulpar (Tabela 4; Figura 4; Figura 6.C).

Os valores dos escores foram submetidos à análise estatística e os resultados estão apresentados, em forma de tabelas e gráficos (Tabelas 1 a 4 e Figuras 1 a 4).

Tabela 1 - Distribuição dos escores e análise estatística dos eventos histomorfométricos da organização e inflamação aguda e crônica do ligamento periodontal (Teste post-hoc de Dunn para cada variável ordinal com 5% de nível de significância)

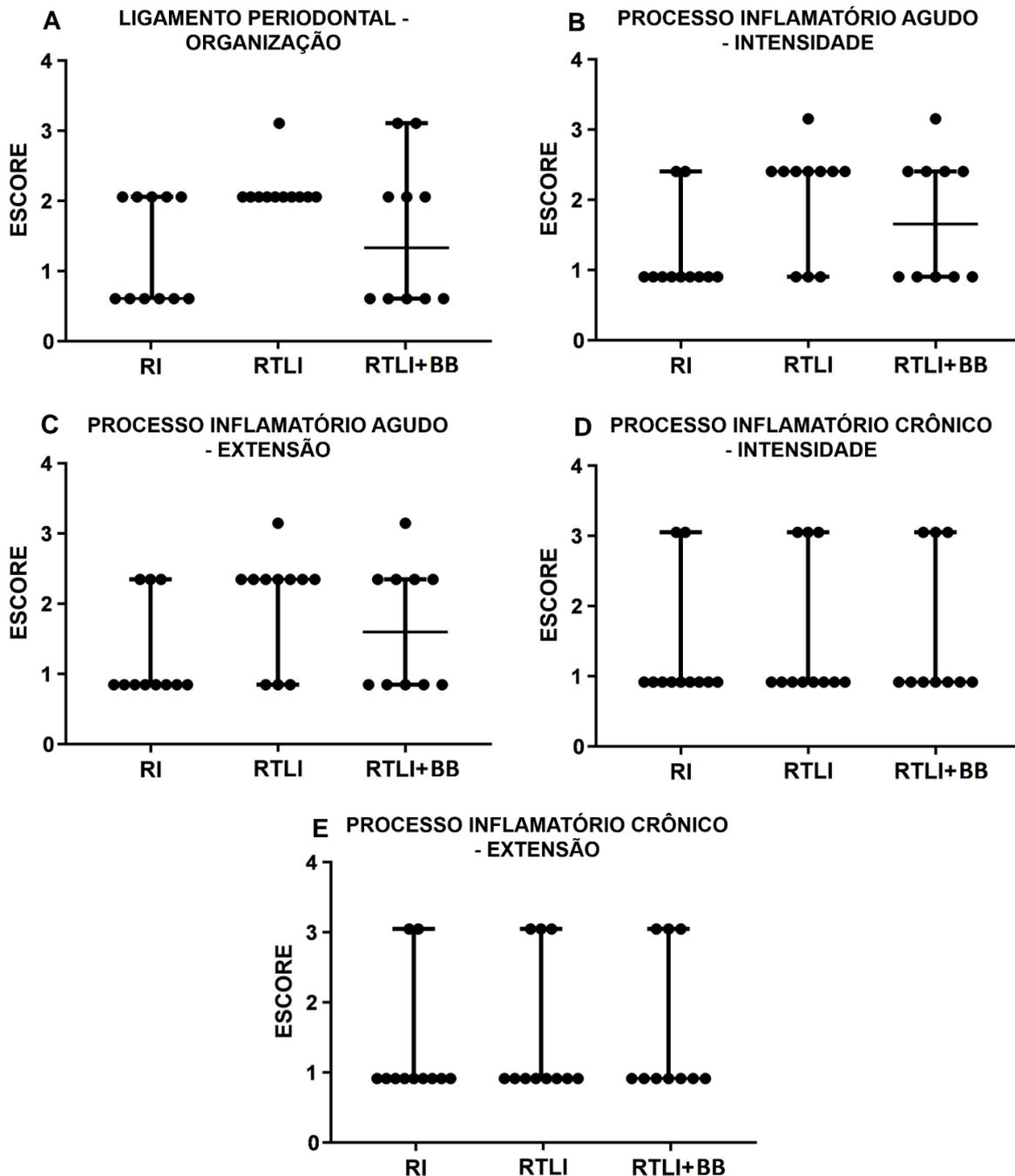
Grupos			
Escore/Número de eventos	RI	RTLl	RTLl+BB
Ligamento periodontal - Organização			
1	6/11	0/11	5/10
2	5/11	10/11	3/10
3	0/11	1/11	2/10
4	0/11	0/11	0/10
Mediana	1	2	2
Comparação entre grupos	A	B	AB
Ligamento periodontal - Inflamação aguda - Intensidade			
1	9/11	3/11	5/10
2	2/11	7/11	4/10
3	0/11	1/11	1/10
4	0/11	0/11	0/10
Mediana	1	2	2
Comparação entre grupos	A	B	AB
Ligamento periodontal - Inflamação aguda - Extensão			
1	8/11	3/11	5/10
2	3/11	7/11	4/10
3	0/11	1/11	1/10
4	0/11	0/11	0/10
Mediana	1	2	2
Comparação entre grupos	A	A	A
Ligamento periodontal - Inflamação crônica - Intensidade			
1	9/11	8/11	7/10
2	2/11	3/11	3/10
3	0/11	0/11	0/10
4	0/11	0/11	0/10
Mediana	1	1	1
Comparação entre grupos	A	A	A
Ligamento periodontal - Inflamação crônica - Extensão			
1	9/11	8/11	7/10
2	2/11	3/11	3/10
3	0/11	0/11	0/10
4	0/11	0/11	0/10
Mediana	1	1	1
Comparação entre grupos	A	A	A
Número total de casos por grupo	11	11	10

RI: Reimplante imediato; RTLl: Reimplante tardio conservado em leite integral; RTLl+BB: Reimplante tardio conservado em leite integral e gavagem com breu-branco.

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos em cada evento.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 1 – Distribuição da mediana dos escores em cada grupo para os eventos histomorfológicos da organização e inflamação aguda e crônica do ligamento periodontal (Teste post-hoc de Dunn para cada variável ordinal com 5% de nível de significância). A: Organização do ligamento periodontal. B: Intensidade do processo inflamatório agudo. C: Extensão do processo inflamatório agudo. D: Intensidade do processo inflamatório crônico. E: Extensão do processo inflamatório crônico



RI: Reimplante imediato; RTLI: Reimplante tardio conservado em leite integral; RTLI+BB: Reimplante tardio conservado em leite integral e gavagem com breu-branco.

FONTE: Elaborado pelo autor (2022).

Tabela 2 - Distribuição dos escores e análise estatística dos eventos histomorfológicos na raiz dentária (Teste post-hoc de Dunn para cada variável ordinal com 5% de nível de significância)

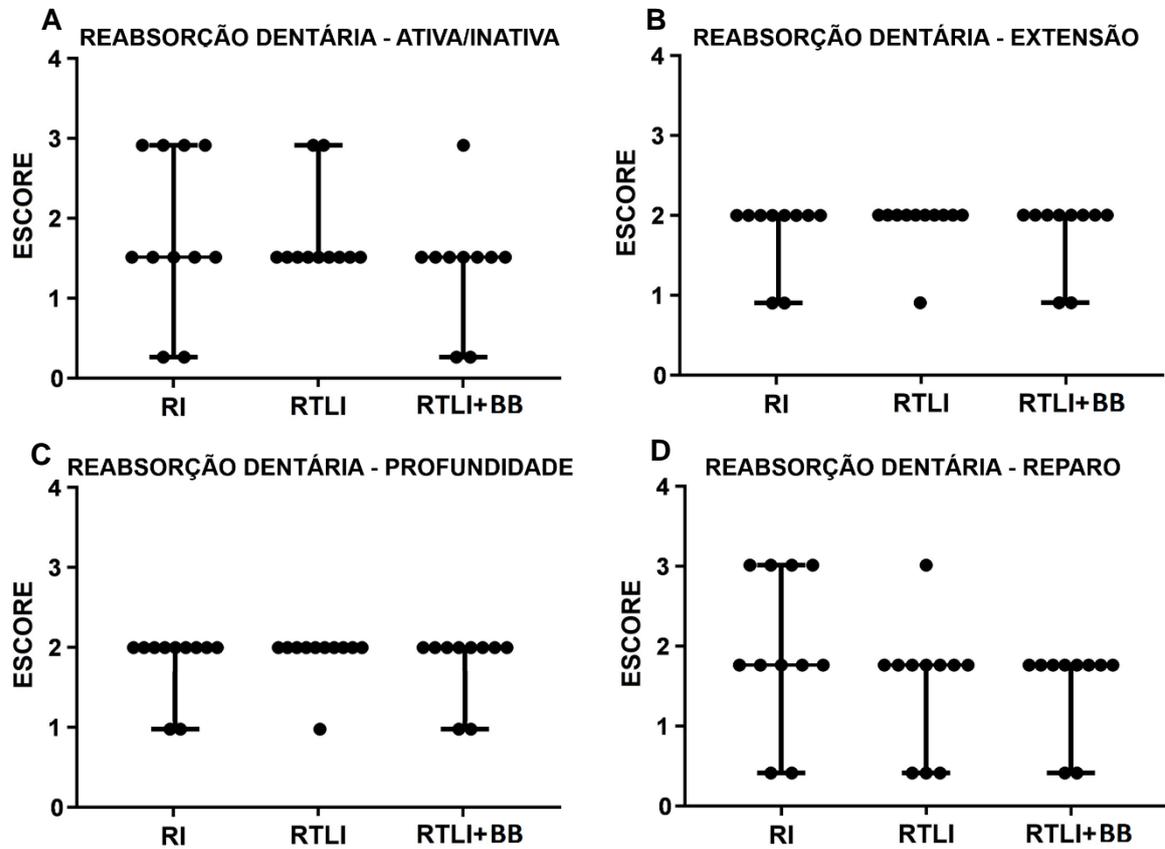
Grupos			
Escore/Número de eventos	RI	RTLI	RTLI+BB
Reabsorção dentária - Ativa/Inativa			
1	2/11	0/11	2/10
2	5/11	9/11	7/10
3	4/11	2/11	1/10
4	0/11	0/11	0/10
Mediana	2	2	2
Comparação entre grupos	A	A	A
Reabsorção dentária - Extensão			
1	2/11	1/11	2/10
2	9/11	10/11	8/10
3	0/11	0/11	0/10
4	0/11	0/11	0/10
Mediana	2	2	2
Comparação entre grupos	A	A	A
Reabsorção dentária - Profundidade			
1	2/11	1/11	2/10
2	9/11	10/11	8/10
3	0/11	0/11	0/10
4	0/11	0/11	0/10
Mediana	2	2	2
Comparação entre grupos	A	A	A
Reabsorção dentária - Reparo			
1	2/11	3/11	2/10
2	5/11	7/11	8/10
3	4/11	1/11	0/10
4	0/11	0/11	0/10
Mediana	2	2	2
Comparação entre grupos	A	A	A
Número total de casos por grupo	11	11	10

RI: Reimplante imediato; RTLI: Reimplante tardio conservado em leite integral; RTLI+BB: Reimplante tardio conservado em leite integral e gavagem com breu-branco.

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos em cada evento.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 2 - Distribuição da mediana dos escores em cada grupo para os eventos histomorfológicos da raiz dentária (Teste post-hoc de Dunn para cada variável ordinal com 5% de nível de significância). A: Reabsorção dentária ativa ou inativa. B: Extensão da reabsorção dentária. C: Profundidade da reabsorção dentária. D: Reparo das áreas de reabsorção dentária



RI: Reimplante imediato; RTLI: Reimplante tardio conservado em leite integral; RTLI+BB: Reimplante tardio conservado em leite integral e gavagem com breu-branco.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Tabela 3 - Distribuição dos escores e análise estatística dos eventos histomorfológicos do osso alveolar (Teste post-hoc de Dunn para cada variável ordinal com 5% de nível de significância)

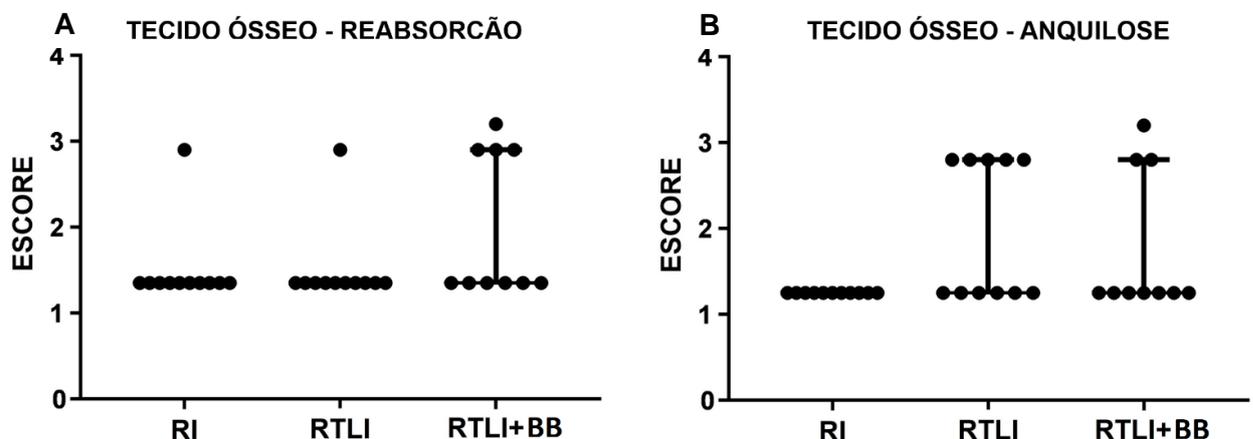
Grupos			
Escore/Número de eventos	RI	RTLI	RTLI+BB
Tecido ósseo - Reabsorção			
1	10/11	10/11	6/10
2	1/11	1/11	3/10
3	0/11	0/11	1/10
4	0/11	0/11	0/10
Mediana	1	1	1
Comparação entre grupos	A	A	A
Tecido ósseo - Anquilose			
1	11/11	6/11	7/10
2	0/11	5/11	2/10
3	0/11	0/11	1/10
4	0/11	0/11	0/10
Mediana	1	1	1
Comparação entre grupos	A	A	A
Número total de casos por grupo	11	11	10

RI: Reimplante imediato; RTLI: Reimplante tardio conservado em leite integral; RTLI+BB: Reimplante tardio conservado em leite integral e gavagem com breu-branco.

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos em cada evento.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

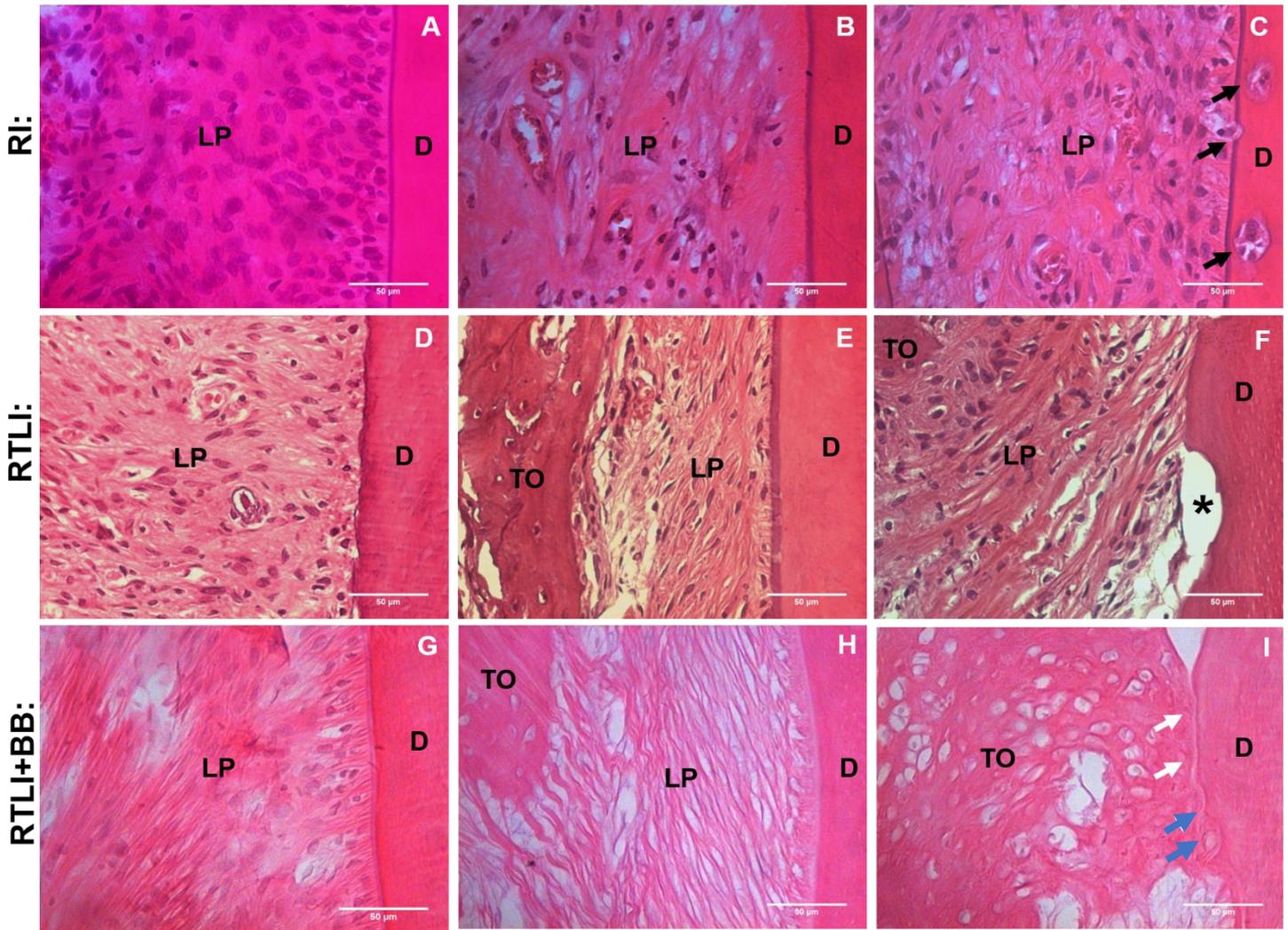
Figura 3 - Distribuição da mediana dos escores em cada grupo para os eventos histomorfológicos do osso alveolar (Teste post-hoc de Dunn para cada variável ordinal com 5% de nível de significância). A: Reabsorção do tecido ósseo adjacente. B: Áreas de anquilose na raiz dentária



RI: Reimplante imediato; RTLI: Reimplante tardio conservado em leite integral; RTLI+BB: Reimplante tardio conservado em leite integral e gavagem com breu-branco.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

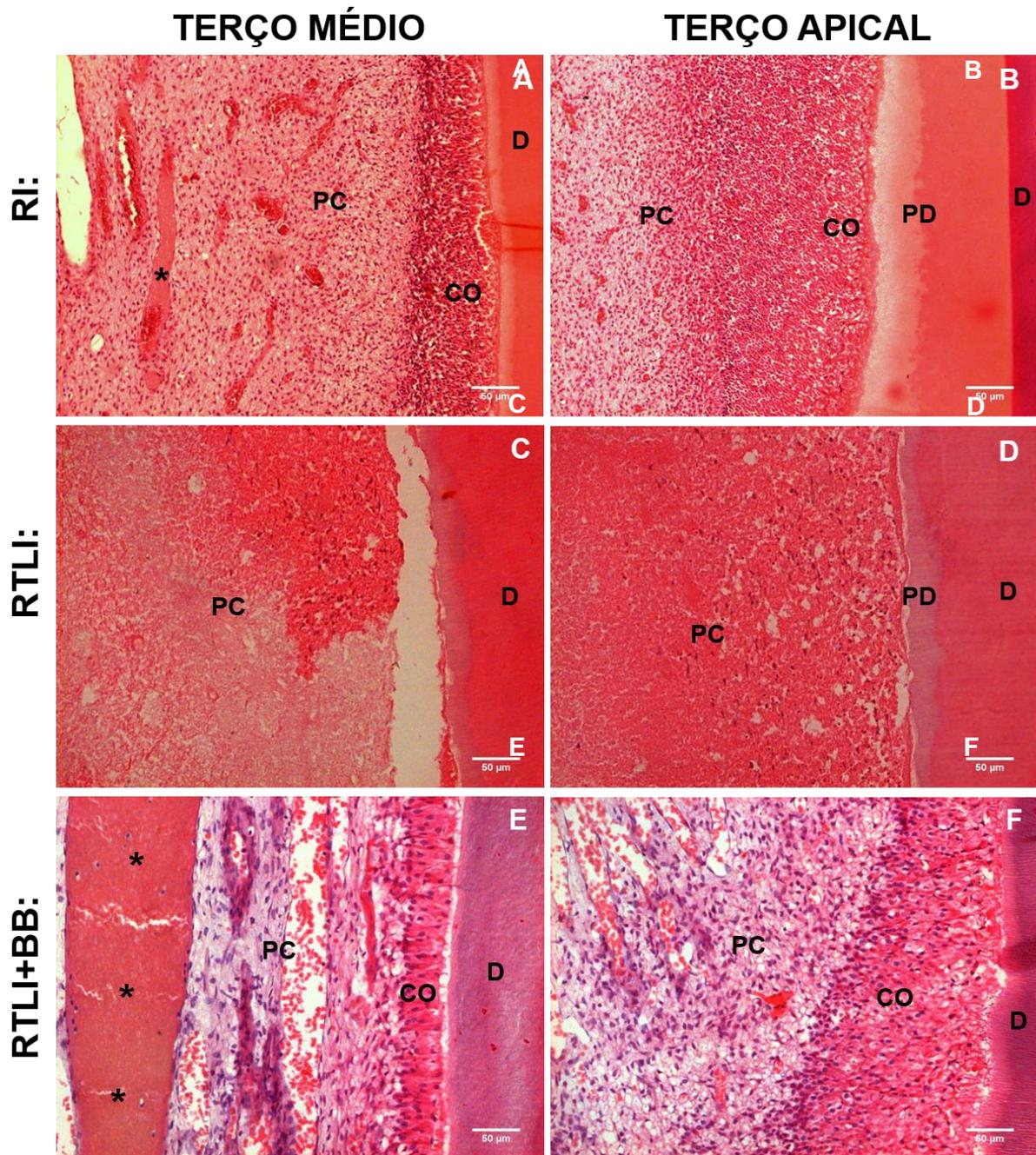
Figura 5 - Cortes longitudinais da superfície radicular no terço médio da face palatina do Incisivo central superior direito, corados em Hematoxilina e Eosina, sob microscopia de luz



RI: Reimplante imediato - (A-B) Organização do ligamento periodontal, integridade da camada de cimento e dentina. (C) Presença de pequenos pontos de reabsorção comprometendo a superfície radicular (Seta preta); RTLI: Reimplante tardio conservado em leite integral - (D) Organização do ligamento periodontal, integridade do cimento e dentina. (E) Ligamento periodontal com fibras colágenas dispostas paralelamente à superfície radicular. (F) Área de reabsorção radicular inflamatória comprometendo o terço médio da raiz (Asterisco). RTLI+BB: Reimplante tardio conservado em leite integral e gavagem com breu-branco - (G) Organização do ligamento periodontal, integridade da dentina e cimento. (H) Reparação do ligamento periodontal, com fibras colágenas escassas, integridade da dentina e do tecido ósseo. (I) Área de anquilose (Seta branca) e reabsorção por substituição no terço médio da raiz (Seta azul).
LP- Ligamento periodontal; D- Dentina; TO- Tecido ósseo.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 6 - Cortes longitudinais do tecido pulpar nos terços médio e apical da raiz do incisivo central superior direito, corados em Hematoxilina e Eosina, sob microscopia de luz



RI: Reimplante imediato - (A-B) Dentina, camada acelular e camada de células odontoblásticas íntegras, presença de infiltrado inflamatório na porção apical e áreas de calcificação no terço médio (Asterisco). RTL: Reimplante tardio conservado em leite integral - (C-D) Polpa dentária com células e camadas apresentando degeneração nos terços médio e apical. RTL+BB: Reimplante tardio conservado em leite integral e gavagem com breu-branco - (E-F) Dentina e camada de células odontoblásticas preservadas, presença de área de calcificação no terço médio (Asterisco) e presença de células inflamatórias no terço apical.

D- Dentina; PC- Polpa central; CO- Camada de células odontoblásticas; PD- Pré-dentina.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Discussão

5 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou a eficácia da solução de breu-branco a 10%, proveniente da resina de *Protium Heptaphyllum*, diluída em solução de 3% de Tween 80, em ratos por via oral e sem nenhum tipo de alteração sistêmica, para melhor avaliação do potencial anti-inflamatório do composto, quando utilizado nos casos de reimplante dentário.

O grupo RI (reimplante imediato) neste estudo reafirma a importância do reimplante dentário em um período inferior a 5 minutos, em que há apenas um pequeno comprometimento das estruturas periodontais. Assim como o grupo RTLI, com o leite integral como meio de conservação, também reafirma a importância do meio de conservação adequado, quando o reimplante não pode ser realizado de maneira imediata, visto que a maioria das variáveis foram semelhantes entre esses grupos, diferindo apenas nas análises relacionadas a organização do ligamento periodontal e processo inflamatório, onde foram encontrados resultados menos favoráveis no grupo RTLI. De modo geral, o grupo experimental em que foi utilizado o breu-branco (RTLI+BB) via sistêmica apresentou melhores resultados que o grupo RTLI e semelhantes ao grupo RI.

O uso da mesma solução de BB aplicada neste estudo, utilizada como meio de conservação de dentes avulsionados, com uso tópico, obteve resultados semelhantes entre os grupos experimentais no reparo do ligamento periodontal.²⁸ Acredita-se que os efeitos benéficos associados ao breu-branco, podem ter sido inibidos pelos efeitos citotóxicos do tween 80.²⁸ Utilizando a administração do composto de BB por via oral e ajustando o método de diluição, pudemos observar resultados favoráveis no reparo periodontal de dente reimplantados, destacando as taxas inflamatórias baixas na região do ligamento periodontal e apresentando reinserção e organização das fibras colágenas, semelhante ao grupo com reimplante imediato, demonstrando um potencial na ação anti-inflamatória.

As principais vias de agente etiológico da reabsorção inflamatória são a contaminação do ligamento periodontal e a necrose pulpar,^{7,29} locais estes que demonstraram resposta positiva com o uso da solução de breu-branco. A polpa dentária do grupo RTLI+BB, apresentou maior vitalidade pulpar em comparação ao

grupo RTLI, tratado apenas com soro fisiológico. Histologicamente, os grupos RI e RTLI+BB apresentaram comportamento parecidos, com preservação das estruturas pulpares no terço médio, e terço no apical, presença de células inflamatórias, provavelmente devido ao maior trauma que essa região sofre no momento da avulsão dentária.

Dentes avulsionados que foram reimplantados correm risco de desenvolver inflamação, infecção e reabsorção, tanto radicular como óssea.²⁹ Quando as células do ligamento periodontal estão danificadas, podem levar a um ambiente inflamatório, gerando uma resposta mais rápida no desenvolvimento de uma reabsorção.³⁰ Desse modo, dentro de um ambiente de reimplante dentário, visa-se sempre a busca por métodos e técnicas que sejam capazes de diminuir a instalação de um processo inflamatório na região periodontal, gerando menores complicações e maior sobrevivência do dente acometido.

Embora não significativa estatisticamente, o grupo RTLI+BB, apresentou diminuição da presença de reabsorção ativa, assim como um aumento proporcional nos casos de anquilose, além disso pequenas taxas de infiltrado inflamatório na região de ligamento periodontal semelhantes ao grupo controle, demonstrando o potencial do BB na ação anti-inflamatória. Fato este que favorece o prognóstico do reimplante, uma vez que quando há uma inflamação instalada, a mesma inibe a regeneração e reinserção das fibras do ligamento periodontal e podem induzir uma ativação excessiva de osteoclastos, mediada por citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas 6 (IL-6) e 1 β (IL-1 β), causando reabsorção radicular e óssea, o que leva a complicações no prognóstico e reparo periodontal do dente reimplantado.^{7,9,31,32} Do mesmo modo, quando há uma ausência ou uma baixa taxa de contaminação, isso pode favorecer a ocorrência de reabsorção por substituição e anquilose,³³ como encontrado em RTLI+BB.

Estudos indicam que um tempo extra alveolar maior está relacionado com a maior expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-6 e IL-1 β , assim como a expressão de osteoprotegerina, RANK (Ativador do receptor do fator nuclear Kappa-Beta) e RANK-L (Ligante do receptor do ativador do fator nuclear Kappa-Beta).^{9,34,35} Um estudo comparou as respostas imunológicas do reimplante imediato e tardio durante a primeira semana, foi identificado que o reimplante tardio está positivamente correlacionado com a

sinalização de TNF- α via NF- κ B (Fator nuclear kappa B) em comparação com o reimplante imediato, sendo que em condições patológicas os tecidos periodontais sintetizam TNF- α e RANKL, que possuem um papel importante na diferenciação e proliferação de osteoclastos e ligado à reabsorção óssea, TNF- α atua em conjunto com RANKL para induzir a diferenciação osteoclástica através da via NF- κ B.³⁴

Em outro estudo comparando a imunomarcação das proteínas OPG (Osteoprotegerina), RANK e RANKL em um período de 10 e 60 dias, chegaram ao resultado que OPG e RANK estavam presentes em todos os grupos e períodos utilizados, porém RANKL não foi observado no reimplante imediato com 60 dias e RANK estava presente somente com 10 dias no reimplante imediato e tardio, sugerindo assim a efetiva participação no início do processo de reabsorção radicular já nos primeiros dias após o reimplante.³⁶ Com isso, a administração do BB já no primeiro dia de pós-operatório pode ter auxiliado nos resultados mais favoráveis encontrados.

Investigando o mecanismo de ação do potencial anti-inflamatório de breu-branco, nota-se que este possui ação de regulação de citocinas pró-inflamatórias presentes na patologia do reimplante dentário. Os estudos encontrados na literatura que também avaliaram o seu potencial anti-inflamatório buscaram elucidar o mecanismo pelo qual os componentes da resina agem na diminuição da inflamação. O estudo de Holanda-Pinto et al.,²¹ um dos pioneiros na área odontológica, avaliou o composto de breu-branco em ratos com periodontite em fase aguda, em que os ratos receberam doses da mistura duas horas antes da indução da inflamação, por via sistêmica. O estudo mostrou que a mistura foi capaz de atuar na diminuição significativa de TNF- α e a mieloperoxidase gengival associados à periodontite, revelando uma atividade anti-inflamatória na fase inicial da doença periodontal ao quantificar os níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias.

Outros estudos na literatura avaliaram o potencial anti-inflamatório, como Medeiros et al.³⁷ em que utilizaram o componente da resina de breu-branco, a α -amirina isolada, de forma tópica na pele da orelha de camundongos, após indução de lesão inflamatória, foi visto que a amirina exibiu ação anti-inflamatória tópica forte e de início rápido através de um mecanismo envolvendo sua capacidade de inibir os níveis de PGE₂ (Prostaglandina E₂), via inibição da expressão de COX-2 (Ciclo-

oxigenase-2). Além de possuir ação no bloqueio da ativação da NF- κ B, fator de transcrição que está ligado ao controle e expressão genética da cadeia inflamatória.

Em uma linha de estudo semelhante, utilizando a mesma metodologia experimental que o estudo anterior, Otuki et al.³⁸ verificou que a α -amirina, obteve comportamento semelhante ao anti-inflamatório dexametasona, em que foi capaz de inibir eventos importantes da resposta inflamatória, na formação de edema, migração de leucócitos, diminuição da atividade da mieloperoxidase e nos níveis de IL-1 β .

Os estudos consideram que este composto é uma alternativa potencial e relevante para o tratamento de doenças inflamatórias, visto que age de maneira eficaz na diminuição de citocinas pró-inflamatórias e ainda demonstrou possuir início rápido de ação.

A mistura de breu-branco mostra uma vantagem na organização e inflamação do ligamento periodontal, este estudo evidenciou a sua atividade no tecido periodontal e sua influência no controle inflamatório pela análise histomorfológicas. Contudo, esse composto precisa ser mais explorado e serem realizadas novas análises com diferentes tempos de administração, concentrações de breu-branco diferentes e veículos de diluição diferentes. Corroborando com outros estudos, ainda não é totalmente conhecido o mecanismo pelo qual este composto exerce sua modulação inflamatória e reparação tecidual, necessitando ainda de mais estudos visando elucidar esse mecanismo.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

O breu-branco apresentou um resultado promissor para sua utilização como medicação sistêmica em casos de reimplante dentário tardio, por mostrar comportamento semelhante ao reimplante imediato no processo de reparo periodontal e pulpar.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Lam R. Epidemiology and outcomes of traumatic dental injuries: a review of the literature. *Aust Dent J.* 2016;61 Suppl 1:4-20.
2. Ugolini A, Parodi GB, Casali C, Silvestrini-Biavati A, Giacinti F. Work-related traumatic dental injuries: Prevalence, characteristics and risk factors. *Dent Traumatol.* 2018;34(1):36-40.
3. Traebert J, Lacerda JT, Foster Page LA, Thomson WM, Bortoluzzi MC. Impact of traumatic dental injuries on the quality of life of schoolchildren. *Dent Traumatol.* 2012;28(6):423-8.
4. Longo DL, Fumes AC, K uchler EC, Paula-Silva FWG, Nelson-Filho P, Silva LAB. Efficiency of different storage media for avulsed teeth in animal models: a systematic review. *Dent Traumatol.* 2018 Feb;34(1):12-9.
5. Santos CL, Sonoda CK, Poi WR, Panzarini SR, Sundefeld ML, Negri MR. Delayed replantation of rat teeth after use of reconstituted powdered milk as a storage medium. *Dent Traumatol.* 2009;25(1):51-7.
6. Andreasen JO, Andreasen FM. Fundamentos de traumatismo dental: guia de tratamento passo a passo. Porto Alegre: Artmed; 2010.
7. 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(2):76-89.
8. Prueksakorn A, Puasiri S, Ruangsri S, Makeudom A, Sastraruji T, Krisanaprakornkit S, Chailertvanitkul P. The preservative effect of Thai propolis extract on the viability of human periodontal ligament cells. *Dent Traumatol.* 2016;32(6):495-501.
9. Consolaro A. The four mechanisms of dental resorption initiation. *Dental Press J Orthod.* 2013;18(3):7-9.
10. Melo ME, Silva CA, Souza Gomes WD, Silva VF, Brandini DA, Poi WR, Castilho LR, Sonoda CK, Panzarini SR. Immediate tooth replantation in rats: effect of systemic antibiotic therapy with amoxicillin and tetracycline. *Clin Oral Investig.* 2016;20(3):523-32.

11. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS: atitude de ampliação de acesso. 2nd ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2015.
12. de Almeida PD, Boleti AP, Rüdiger AL, Lourenço GA, Veiga Junior VF, Lima ES. Anti-inflammatory activity of triterpenes isolated from protium paniculatum oil-resins. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;2015:293768.
13. Aragão GF, Carneiro LM, Junior AP, Vieira LC, Bandeira PN, Lemos TL, Viana GS. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006;85(4):827-34.
14. Aragão GF, Carneiro LMV, Júnior APF, Bandeira PN, Lemos TLG, Viana GSB. Antiplatelet activity of α - and β -amyrin, isomeric mixture from *protium heptaphyllum*. *Pharm Biol*. 2007;45(5):343-9.
15. Aragão GF, Cunha Pinheiro MC, Nogueira Bandeira P, Gomes Lemos TL, de Barros Viana GS. Analgesic and anti-inflammatory activities of the isomeric mixture of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) march. *J Herb Pharmacother*. 2007;7(2):31-47.
16. Aragão GF, Carneiro LM, Rota-Junior AP, Bandeira PN, de Lemos TL, Viana GS. Alterations in brain amino acid metabolism and inhibitory effects on PKC are possibly correlated with anticonvulsant effects of the isomeric mixture of α - and β -amyrin from *Protium heptaphyllum*. *Pharm Biol*. 2015;53(3):407-13.
17. Díaz-Ruiz G, Hernández-Vázquez L, Luna H, Wachter-Rodarte Mdel C, Navarro-Ocaña A. Growth inhibition of *Streptococcus* from the oral cavity by α -amyrin esters. *Molecules*. 2012;17(11):12603-11.
18. Melo CM, Morais TC, Tomé AR, Brito GA, Chaves MH, Rao VS, Santos FA. Anti-inflammatory effect of α,β -amyrin, a triterpene from *Protium heptaphyllum*, on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Inflamm Res*. 2011;60(7):673-81.
19. Okoye NN, Ajaghaku DL, Okeke HN, Ilodigwe EE, Nworu CS, Okoye FB. beta-Amyrin and alpha-amyrin acetate isolated from the stem bark of *Alstonia boonei* display profound anti-inflammatory activity. *Pharm Biol*. 2014;52(11):1478-86.

20. Holanda Pinto SA, Pinto LM, Guedes MA, Cunha GM, Chaves MH, Santos FA, Rao VS. Antinociceptive effect of triterpenoid α , β -amyirin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. *Phytomedicine*. 2008;15(8):630-4.
21. Holanda Pinto SA, Pinto LM, Cunha GM, Chaves MH, Santos FA, Rao VS. Anti-inflammatory effect of α , β -Amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. *Inflammopharmacology*. 2008;16(1):48-52.
22. Santos FA, Frota JT, Arruda BR, de Melo TS, da Silva AA, Brito GA, Chaves MH, Rao VS. Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α , β -amyirin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. *Lipids Health Dis*. 2012;11:98.
23. Soldi C, Pizzolatti MG, Luiz AP, Marcon R, Meotti FC, Miotto LA, Santos AR. Synthetic derivatives of the α - and β -amyirin triterpenes and their antinociceptive properties. *Bioorg Med Chem*. 2008;16(6):3377-86.
24. Vieira Júnior GMV, Souza CML, Chaves MH. Resina de *Protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. *Quim Nova*. 2005;28(2):183-7.
25. Lima EM, Nascimento AM, Lenz D, Scherer R, Meyrelles SS, Böechat GAP, Andrade TU, Endringer DC. Triterpenes from the *Protium heptaphyllum* resin-chemical composition and cytotoxicity. *Rev Bras Farmacogn*. 2014;24(4):399-407.
26. Panzarini SR, Holland R, de Souza V, Poi WR, Sonoda CK, Pedrini D. Mineral trioxide aggregate as a root canal filling material in reimplanted teeth. Microscopic analysis in monkeys. *Dent Traumatol*. 2007;23(5):265-72.
27. Brandini DA, Amaral MF, Debortoli CVL, Panzarini SR. Immediate tooth replantation: root canal filling for delayed initiation of endodontic treatment. *Braz Oral Res*. 2018;32:e7.
28. Côvre LM, Debortoli CVL, Amaral MF, Carvalho AA, Freitas JS, Vieira Júnior GM, Chaves MH, Casatti CA, Brandini DA. Use of α and β -amyirin mixture as a storage medium in dental replantation. *Res Soc Dev*. 2020;9(9):e948998134.

29. Holland R, Otoboni Filho JA, Bernabé PF, Nery MJ, de Souza V, Berbert A. Effect of root canal status on periodontal healing after surgical injury in dogs. *Endod Dent Traumatol.* 1994;10(2):77-82.
30. Kostka E, Meissner S, Finke CH, Mandirola M, Preissner S. Multidisciplinary treatment options of tooth avulsion considering different therapy concepts. *Open Dent J.* 2014;8:180-3.
31. Iglesias-Linares A, Hartsfield JK Jr. Cellular and Molecular Pathways Leading to External Root Resorption. *J Dent Res.* 2017;96(2):145-52.
32. Takashiba S, Naruishi K, Murayama Y. Perspective of cytokine regulation for periodontal treatment: fibroblast biology. *J Periodontol.* 2003;74(1):103-10.
33. Caglar E, Sandalli N, Kuscu OO, Durhan MA, Pisirciler R, Caliskan EA, Kargul B. Viability of fibroblasts in a novel probiotic storage media. *Dent Traumatol.* 2010;26(5):383-7.
34. Panzarini SR, Okamoto R, Poi WR, Sonoda CK, Pedrini D, da Silva PE, Saito CT, Marão HF, Sedlacek P. Histological and immunohistochemical analyses of the chronology of healing process after immediate tooth replantation in incisor rat teeth. *Dent Traumatol.* 2013;29(1):15-22.
35. Chae YK, Shin SY, Kang SW, Choi SC, Nam OH. Differential gene expression profiles of periodontal soft tissue from rat teeth after immediate and delayed replantation: a pilot study. *J Periodontal Implant Sci.* 2022;52(2):127-140.
36. Manfrin TM. OPG, RANK and RANKL immunostaining in replanted rat teeth [Thesis]. Araçatuba, São Paulo: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2007, 73 pp.
37. Medeiros R, Otuki MF, Avellar MC, Calixto JB. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene alpha-amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Eur J Pharmacol.* 2007;559(2-3):227-35.
38. Otuki MF, Vieira-Lima F, Malheiros A, Yunes RA, Calixto JB. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. *Eur J Pharmacol.* 2005;507(1-3):253-9.

Anexos

ANEXO A - APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Efeito da utilização sistêmica da mistura de alfa e beta-amirina sobre o processo de reparo periodontal em reimplante dentário"**, Processo FOA nº 00607-2020, sob responsabilidade de Daniela Atili Brandini de Weert apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 01 de Dezembro de 2020.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Dezembro de 2023.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Janeiro de 2024.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Effect of systemic use of alpha and beta-amyrin mixture on the periodontal repair process in dental replantation"**, Protocol FOA nº 00607-2020, under the supervision of Daniela Atili Brandini de Weert presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on December 01, 2020.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: December 01, 2023.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: January 01, 2024.

Prof. Associado Guilherme de Paula Nogueira
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br