



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



ARIELE PATRICIA RABELLO

***EFEITO DA LASERTERAPIA E DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS
EM DENTES REIMPLANTADOS TARDIAMENTE: ANÁLISE HISTOLÓGICA,
HISTOQUÍMICA E POR MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA.***

Araraquara

2017



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



ARIELE PATRICIA RABELLO

***EFEITO DA LASERTERAPIA E DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS
EM DENTES REIMPLANTADOS TARDIAMENTE: ANÁLISE HISTOLÓGICA,
HISTOQUÍMICA E POR MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA.***

Tese apresentada ao programa de pós-Graduação
em Odontologia – Área de Endodontia, da
Faculdade de Odontologia de Araraquara, da
Universidade Estadual Paulista para obtenção do
Título de Doutor em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Fábio L. C. V. Berbert
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Gisele Faria

Araraquara

2017

Rabello, Ariele Patricia

Efeito da laserterapia e do plasma rico em plaquetas em dentes reimplantados tardiamente: análise histológica, histoquímica e por microtomografia computadorizada / Ariele Patricia Rabello.-- Araraquara: [s.n.], 2017

85 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Endodontia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Fábio L. C. V. Berbert

Co-orientadora: Profa. Dra. Gisele Faria

1. Reimplante dentário 2. Plasma rico em plaquetas 3. Terapia com luz de baixa intensidade I. Título

ARIELE PATRICIA RABELLO

EFEITO DA LASERTERAPIA E DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM DENTES REIMPLANTADOS TARDIAMENTE: ANÁLISE HISTOLÓGICA, HISTOQUÍMICA E POR MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA.

Comissão Julgadora

Tese para obtenção do Grau de Doutor

Presidente e orientador: Prof. Dr. Fábio L. C. V. Berbert

2º Examinador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

3º Examinador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

4º Examinador: Profa. Dra. Roberta Bosso Martelo

5º Examinador: Profa. Dra. Sônia Regina Panzarini

Araraquara, 17 de março de 2017.

DADOS CURRICULARES

ARIELE PATRICIA RABELLO

NASCIMENTO	15.07.1983 –BARIRI/SP
FILIAÇÃO	Maria Aparecida Furlanetto Rabello Lupércio Cláudio Rabello
2002/2006	Curso de Graduação – Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2008/2010	Curso de Especialização em Endodontia – Fundação Araraquarense de Ensino e Pesquisa em Odontologia – FAEPO
2010/2012	Curso de Pós-Graduação em Odontologia (Área de concentração Endodontia), nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.
2013/2017	Pós-graduação em Odontologia – Área de Endodontia, nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese:

À Deus,

pela sua proteção divina e por conceder a oportunidade de realização e conclusão de mais uma etapa importante em minha vida!

Aos meus pais, Maria e Lupércio, minha irmã Aline e meu amor Elvis

Que sempre estão prontos a me proteger, me confortar,
me escutar, me incentivar e apoiar!

Vocês são meus exemplos de amor, proteção
honestidade, trabalho, e força!

**Aos meus avós maternos, Olga e Juvenal, meus tios Vitória, Álvaro e Mário
(in memorian)**

Dedico a vocês que tanto lutaram nessa vida! E nos deixaram num breve espaço de tempo... Tudo o que eu mais queria nesse momento, era voltar a ser criança, para podermos passar mais tempo juntos! Amo cada um de vocês!

Saudade imensa!

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)**, na pessoa de seu Magnífico Reitor Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini e vice-reitor Prof. Dr. Sérgio Roberto Nobre.

À *Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP*, na pessoa da sua Diretora Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato e vice-diretor Prof. Dr. Edson Alvez Campos.

Ao *Departamento de Odontologia Restauradora* da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representado pela Chefe de Departamento Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru e vice-chefe Prof. Dr. Milton Carlos Kuga.

Ao *Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Endodontia*, coordenado pelo Prof. Dr. Carlos Rossa Junior, pelo constante estímulo à pesquisa.

Ao *meu orientador Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert*, pela valiosa orientação durante a realização desse trabalho; pelos conselhos e pelos ensinamentos tanto para o desenvolvimento dessa tese, como para meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada pela oportunidade de poder aprender com você, pela compreensão, pela confiança e amizade conquistadas ao longo desses anos.

À *minha co-orientadora Profa. Dra. Gisele Faria*, por toda atenção, disponibilidade e ajuda durante o desenvolvimento desse trabalho, por todo o conhecimento transmitido todos esses anos, pela amizade conquistada. Prof^a Gi, você é um exemplo para mim, a pessoa em quem eu me espelho nessa jornada acadêmica!

Ao *Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo*, por todas as oportunidades de aprendizado durante essa caminhada. Por sempre estar disposto a ajudar, e por me convencer a nunca desistir de um sonho! Tenho enorme admiração e carinho pelo senhor!

Aos *docentes do Departamento de Odontologia Restauradora* da Faculdade de Odontologia de Araraquara, em especial aos professores da disciplina de Endodontia, Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho, Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho, Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru, Prof. Dr. Milton Carlos Kuga, por todo o conhecimento transmitido a mim, pelo estímulo a seguir a pós-graduação, pela amizade e harmonioso convívio, fazendo com que eu me sentisse feliz na minha segunda casa.

À *todos os professores do curso de pós-graduação*, pelos conhecimentos, apoio e amizade a mim dedicados.

Aos *funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora* desta Faculdade, Creusa, Cida, Marinho, Vanderlei e Alessandra (in memoriam). Tenho enorme carinho por todos vocês, obrigada pela amizade, pelos bate-papos, e por cada “Bom dia” com um lindo sorriso no rosto! Vou guardá-los para sempre em meu coração!

Aos professores: **Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri**, **Profa. Dra. Amanda Martins Baviera** e **Prof. Dr. Iguatemy Bruneti** e **Prof. Dr. Paulo Inácio** pela essencial e importantíssima ajuda durante a realização desse trabalho. Obrigada por me acolherem e me ensinarem não somente sobre técnicas laboratoriais como também a essência da amizade dentro do ambiente de trabalho. Minha eterna gratidão a todos vocês!

À **Profa. Dra. Camila Pinelli**, pela amizade conquistada, pelo carinho durante todo o período em que tivemos a oportunidade de trabalhar juntas, o qual permanece até hoje. Obrigada pelo incentivo e coragem transmitidos a mim para que eu seguisse a vida acadêmica. Obrigada pela generosidade em compartilhar todo seu conhecimento e cultura. Camila, você é especial para mim, tenho muito carinho por você!

À **Profa. Dra. Cláudia Pinheiro** pelas oportunidades e confiança em meu trabalho. Serei eternamente grata! Obrigada!

Ao técnico do Laboratório de Histologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP, **Pedro Sérgio Simões**, pela ajuda durante o processamento da parte experimental deste estudo, por me transmitir seus conhecimentos e pela amizade demonstrada.

À técnica do biotério da farmácia, **Vivian**, e à funcionária do Hemonúcleo Regional de Araraquara, **Cristina Marta Oliveira**, pela ajuda no início desse trabalho.

À técnica do Laboratório de Microtomografia, ***Luana Elis Sabino***, por toda ajuda durante a realização da fase experimental que utilizei o microtomógrafo. Obrigada por transmitir seus conhecimentos e pela amizade adquirida nesses anos!

Aos ***funcionários da Seção de Pós-Graduação, Mara, Alexandre e Cristiano***, pela ajuda em todas as horas necessárias, pela gentileza em sempre me ouvir e esclarecer todas minhas dúvidas sobre a pós-graduação, pelo carisma e simpatia com que sempre me atendem, e principalmete pela educação e paciência em todos os momentos.

Aos ***funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP***, pela educação, respeito e boa vontade no auxílio das pesquisas bibliográficas em especial à **Ceres** pelas correções dessa tese.

Aos ***funcionários da Seção de Esterilização***, por serem sempre prestativos e prontos para ajudar.

À ***Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)*** pela concessão da bolsa de estudos de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processo FAPESP - 2014/23912-8) pelo auxílio à pesquisa concedido para realização desse projeto.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Deus e à Nossa Senhora** pois em ELES nada existe. Por estar presente em todos os dias da minha vida, guiando meus passos e iluminado meu caminho. Por me fizeram acreditar que eu seria capaz: me abençoaram, iluminaram e me protegeram de todo o mal fazendo com que em cada amanhecer eu pudesse abrir meus olhos para uma nova oportunidade de vida e um novo recomeço.

Ao **meu anjo da guarda**, por estar sempre me protegendo e me acompanhando.

Aos **meus pais, Maria e Lupércio**, pela educação recebida desde sempre, pelo apoio emocional e financeiro, por toda uma vida de dedicação nunca me negando nada, pelo imenso esforço para que eu realizasse mais um sonho, por todo amor e carinho recebido, pelo exemplo de vida e fortaleza que são para mim. Amo vocês!

À **Minha Mãe Maria Aparecida Furlanetto Rabello**, minha mãezinha querida, tão amada, tão amiga, super compreensiva, super dedicada não só a mim, como à toda minha família e a todos que a cercam. Minha mamis adorada, em seus braços sempre encontrei o aconchego e com seu jeitinho acolhedor sempre me fez sentir um ser humano especial. Sempre tão preocupada. Meu amor, minha vida, meus passos seguem os teus neste longo percurso... Uma caminhada tão longa, tão difícil, mas que, com você ao meu lado, tornou-se prazerosa. E eu só tenho a agradecer por tudo e por tanto que sempre fez por mim. Pudera eu, retribuir à você, minha doce Maria, o mínimo de tudo que já fez e que ainda faz por mim. Tudo que sou, devo à você! Que soube me educar e me ensinar a escolher o caminho correto, e a sempre fazer o bem. Sou muito grata e reconheço tudo o que me proporcionou até agora. Eu amo você!

Ao *Meu Pai Lupércio Cláudio Rabello*, que sempre acreditou em mim sendo a pessoa mais otimista que eu poderia ter na vida. Seria muito clichê dizer que você é o melhor Pai do Mundo!!! Você é muito mais! Meu pai querido, meu pai amado. É o Meu papai. Você é mais que melhor, é minha paixão, é o meu amor. Tem um coração enorme, que não cabe no peito. Com uma generosidade gigantesca. Você é meu herói, meu papai noel, meu caixa forte, (rs), meu coração, meu tudo. Raras foram às vezes que você me disse não para alguma coisa que eu queria, que às vezes, mesmo não podendo me dava. Eu te amo de todo meu coração. É com todo o carinho que agradeço você. Obrigada por tudo! Meu papai querido, meu papai amado. Que Deus te abençoe, e proteja sempre, te proporcionando muita saúde e muitas alegrias. Obrigada por acreditar em mim e fazer com que meu sonho pudesse ser realizado. Eu amo você!

À *minha irmã Aline*, pelo amor, amizade, companheirismo e otimismo, e por todos os “eu já sabia” ouvidos após conversarmos sobre algo que eu tinha conquistado. A minha irmã que eu tanto amo, e que tanto fico longe. Prometo que “daqui pra frente tudo vai ser diferente”! Amo você!

Ao *meu querido Elvis*, pelo amor, carinho, companheirismo, cumplicidade, alegria, admiração. Obrigada pelo incentivo aos estudos, pelo respeito, e pela paciência e entendimento por cada fim de semana, férias, ou qualquer outro dia longe devido minhas atividades da faculdade. Obrigada por fazer parte da minha vida e deixar meus dias mais lindos! Obrigada por estar sempre me esperando! Você é muito importante para mim! “Quero, sua risada mais gostosa, esse seu jeito de achar que a vida pode ser maravilhosa!!!” Como sua alegria e suas gargalhadas me fazem falta! Amo você e te amarei para sempre!

À *minha tia Cacilda*, pela sua constante preocupação comigo, pelas promessas feitas, por seu amor e carinho. Eu amo você!

Aos meus avós *Juca e Irene*, por todo amor que só os avós sabem ter!!!
Eu amo vocês!!!!

À *minha segunda família*, Luzia, Flor, Emerson, Anelisa, Evando, Andreza, Hércules e Rosângela, pela linda convivência, pelos momentos de distração e risadas aos fins de semana e fins de tarde, embora poucos, sempre prazerosos.

Aos *meus sobrinhos Bianca, Tulio, Luiza e Leonardo*, pelo colorido especial que dão à minha vida!

À *minha querida amiga Dani*, por todos esses anos de convívio, pela amizade sincera, pelo acolhimento na casa de seus pais, pelos conselhos. Por todos os momentos de divertimento, de estudos e de apoio e pelos seus valiosos e verdadeiros conselhos. Agradeço por ser minha irmã de coração! Eu amo você!

Às *minhas queridas amigas Gisselle e Roberta*, por tudo o que fizeram por mim, pelo maravilhoso convívio, pelos conselhos, risadas, puxões de orelha, pelo carinho e atenção, pela ajuda nas horas complicadas, pela paciência, pelo afeto, carisma, alegria. Obrigada por fazerem parte de uma etapa tão importante em minha vida, tão importante quanto vocês são para mim!

Aos *meus amigos de Bariri*, principalmente à Anelisa, Tone, Sueli, Andréa, Marquinhos, pela convivência, pela alegria, pela grande amizade, por sempre estarem prontos para tudo. Sinto muita falta de vocês!

À *todos os meus amigos da pós-graduação*, pela amizade, respeito e boa convivência. Quero agradecer especialmente ao *Adinael Trindade Junior (in memoriam)*, obrigada por todos seus ensinamentos, que não eram restritos somente à Endodontia! Obrigada pela convivência e pela oportunidade de ter te conhecido. Um dia vamos nos reencontrar!

À *todos os amigos* que fiz no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia de Araraquara/UNESP e no Laboratório de Histologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP. Obrigada pela convivência, amizade, gentileza e educação diárias.

***Obrigada a todos que de alguma forma
colaboraram na realização deste trabalho.***

Rabello AP. Efeito da laserterapia e do plasma rico em plaquetas em dentes reimplantados tardiamente: análise histológica, histoquímica e por microtomografia computadorizada [Tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

RESUMO

O melhor tratamento para dentes permanentes avulsionados é o reimplante imediato, porém, quando o dente permanece fora do alvéolo por longo período, o prognóstico pode ser prejudicado. Condutas têm sido buscadas na tentativa de melhorar os problemas decorrentes de reimplantes tardios. A laserterapia, devido à sua propriedade anti-inflamatória, e o plasma rico em plaquetas (PRP), devido à liberação de fatores de crescimento, são boas alternativas visando atenuar o processo inflamatório e auxiliar o processo de reparo. Avaliou-se os efeitos da laserterapia, da aplicação do PRP e da associação de ambos sobre o reimplante tardio de incisivos superiores de ratos. Cinquenta animais foram divididos em dez grupos experimentais (n=5): grupo controle onde o incisivo superior direito não recebeu alguma intervenção, e nove grupos onde houve a extração dentária simulando uma avulsão seguida do reimplante após 40 minutos. Em um desses grupos, a polpa foi mantida no canal radicular, e os demais foram submetidos à um protocolo de tratamento, de acordo com a condição da cavidade pulpar (manutenção da polpa, preenchimento com hidróxido de cálcio ou preenchimento com PRP) e tratamento do alvéolo/periodonto (coágulo ou PRP com ou sem laserterapia). As avaliações foram realizadas por meio de análise histológica e histoquímica após 30 dias e por microtomografia computadorizada (micro-CT) sobrepondo-se as imagens dos períodos imediato e 30 dias após o reimplante. Os dados obtidos a partir das avaliações histológica e histoquímica foram analisados pelos testes ANOVA e Tukey e os dados microtomográficos pelos testes Kruskal Wallis e Dunn, com nível de significância 5%. Após análise histológica e histoquímica, verificou-se que não houve diferença estatística significativa entre os grupos quanto ao número de clastos/mm de superfície reabsorvida ($p > 0,05$). Nos grupos onde o PRP foi inserido no alvéolo dentário, independentemente da associação ao laser ou do tratamento intracanal, a porcentagem de reabsorção radicular foi menor do que no grupo que recebeu o tratamento convencional com hidróxido de cálcio intracanal e coágulo no alvéolo -HC/Co ($p < 0,05$). Nos grupos onde o coágulo foi mantido no alvéolo, somente o grupo que foi irradiado com LBI e o canal preenchido com PRP (PRP/Co/L) apresentou índice de reabsorção radicular significativamente menor que o grupo HC/Co ($p < 0,05$). Os resultados obtidos pela análise micro-CT mostraram que o PRP ou LBI empregados isoladamente não ofereceram melhora significativa nos índices de reabsorção radicular de dentes de rato reimplantados tardiamente ($p < 0,05$). Os grupos que foram tratados com a associação do PRP no alvéolo e com a irradiação com LBI, independentemente do material usado para preencher o canal radicular, apresentaram menos reabsorção radicular em relação ao grupo HC/Co ($p < 0,05$). Pode-se concluir que a associação PRP e LBI pode se constituir em um protocolo promissor de tratamento de dentes reimplantados tardiamente.

Palavras-Chave*: Reimplante dentário. Plasma rico em plaquetas. Terapia com luz de baixa intensidade

* Conforme Descritores em Ciências da Saúde – DeCS (Bireme) e Normas FOAr.

Rabello AP. Effect of low-level laser therapy and platelet-rich plasma on delayed on replanted teeth: a histological, histochemical and microtomographic analysis [Tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

ABSTRACT

The best treatment for avulsed permanent teeth is immediate replantation, but when the tooth remains outside the alveolus for a long period, the prognosis may be impaired. Pipelines have been sought in an attempt to improve the problems arising from late reimplants. Laser therapy, due to its anti-inflammatory property, and platelet-rich plasma (PRP), due to the release of growth factors, are good alternatives aimed at attenuating the inflammatory process and assisting the repair process. The effects of laser therapy, the application of PRP and the association of both on the delayed replantation of upper incisors of rats were evaluated. Fifty animals were divided into ten experimental groups ($n = 5$): control group where the right upper incisor did not receive any intervention, and nine groups where the dental extraction was performed simulating an avulsion followed by reimplantation after 40 minutes. In one of these groups, the pulp was maintained in the root canal, and the others were submitted to a treatment protocol, according to the condition of the pulp cavity (pulp maintenance, calcium hydroxide filling or filling with PRP) and treatment of the pulp. Alveolus / periodontium (clot or PRP with or without laser therapy). The evaluations were performed through histological and histochemical analysis after 30 days and by computerized microtomography (micro-CT) overlapping the images of the periods immediately and 30 days after the replantation. The data obtained from the histological and histochemical evaluations were analyzed by the ANOVA and Tukey tests and the microtomographic data by the Kruskal Wallis and Dunn tests, with a significance level of 5%. After histological and histochemical analysis, it was verified that there was no statistically significant difference between groups regarding the number of clasts/mm of resorbed surface ($p > 0.05$). In the groups where PRP was inserted into the dental alveolus, regardless of the association with the laser or the intracanal treatment, the percentage of root resorption was lower than in the group that received the conventional treatment with intracanal calcium hydroxide and blood clot in the alveolus - HC/Co ($P < 0.05$). In the groups where the clot was kept in the alveolus, only the group that was irradiated with LBI and the channel filled with PRP (PRP/Co/L) presented a significantly lower root resorption index than the HC/Co group ($p < 0.05$). The results obtained by the micro-CT analysis showed that the PRP or LBI used alone did not offer a significant improvement in the root resorption rates of delayed replanted rat teeth ($p < 0.05$). The groups that were treated with the association of PRP in the alveolus and with LBI irradiation, regardless of the material used to fill the root canal, presented less root resorption in relation to the HC/Co group ($p < 0.05$). It can be concluded that the association PRP and LBI may constitute a promising protocol for treatment of delayed replanted teeth.

Keywords*: Tooth replantation. Platelet-rich plasma. Low-level Light Therapy.

* Conforme Descritores em Ciências da Saúde – DeCS (Bireme) e Normas FOAr.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 PROPOSIÇÃO	23
3 PUBLICAÇÃO 1.....	24
4 PUBLICAÇÃO 2.....	56
5 CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS	75
APÊNDICE	79
ANEXO A	85

1 INTRODUÇÃO

A avulsão de dentes permanentes é uma das decorrências mais graves de um traumatismo orofacial (Andersson et al.¹, 2012), sendo que os incisivos centrais superiores geralmente são os dentes mais afetados. A avulsão dentária é uma lesão traumática complexa caracterizada pela ruptura do feixe neurovascular e do ligamento periodontal expondo o dente ao meio externo (Andreasen², 2007).

O melhor tratamento para dentes permanentes avulsionados é seu reimplante imediato (Santos et al.³⁰, 2009; Reis et al.²⁷, 2014). Porém, em muitos casos o dente permanece por longo tempo fora do alvéolo em condições de armazenamento impróprias, o que prejudica o prognóstico (Santos et al.³⁰, 2009; Ricieri et al.²⁸, 2009; Reis et al.²⁷, 2014).

O reimplante de um dente avulsionado que permanece em meio seco por mais de 5 minutos, é considerado tardio, e nesses casos ocorre grave lesão na superfície radicular, resultando em extensa necrose do ligamento periodontal (Carvalho et al.⁷, 2012). Por isso, é aconselhável que o dente permaneça em meio de armazenamento capaz de manter a viabilidade das células do ligamento periodontal (Santos et al.³⁰, 2009; Andersson et al.¹, 2012). Diversos estudos têm avaliado a eficácia de diferentes meios de armazenamento para acondicionar o dente avulsionado (Santos et al.³⁰, 2009; Ricieri et al.²⁸, 2009; Reis et al.²⁷, 2014). O uso de meios de armazenamento com osmolaridade balanceada, como solução balanceada de Hank's (HBSS), solução salina, saliva ou leite é indicado pela International Association of Dental Traumatology (IADT) (Andersson et al.¹, 2012). O leite tem mostrado bons resultados na manutenção da viabilidade das células do ligamento periodontal, além de ser mais comumente encontrado próximo ao local do acidente (Santos et al.³⁰, 2009; Ricieri et al.²⁸, 2009; Reis et al.²⁷, 2014).

Após o reimplante dentário, os problemas clínicos que ocorrem com maior prevalência são as reabsorções radiculares e anquilose (Komatsu et al.¹⁴, 2008). Nesse caso, dentes avulsionados e reimplantados podem apresentar reabsorção radicular externa inflamatória e reabsorção radicular externa por substituição decorrente da anquilose alvéolo-dentária (Consolaro⁹, 2012, Bastos et al.⁶, 2014, Carvalho et al.⁸, 2016).

A reabsorção radicular externa inflamatória é decorrente de danos ao ligamento periodontal e à superfície radicular no momento da lesão associados à polpa necrótica e infectada (Bastos et al.⁶, 2014). Áreas de reabsorção no cimento e na dentina são observadas junto com a inflamação do tecido periodontal adjacente (Andreasen², 2007). Os processos de reabsorção e inflamação estão diretamente relacionados à gravidade da lesão periodontal e à presença de tecido pulpar necrosado e infectado no canal radicular (Andreasen², 2007, Bastos et al.⁶, 2014, Carvalho et al.⁸, 2016). Assim, na ausência dos cementoblastos, a persistência da inflamação e de seus mediadores sugere que o ambiente tecidual seja propício e estimulador da reabsorção na superfície radicular (Consolaro⁹, 2012; Panzarini et al.²³, 2013).

A anquilose alvéolo-dentária ocorre quando há um dano extenso na camada mais interna do ligamento periodontal e a reparação da parede do alvéolo e do ligamento periodontal adjacente ocorrem simultaneamente, resultando na união do dente ao osso alveolar (Trope et al.³², 2011). Radiograficamente, o espaço do ligamento periodontal está ausente, e há uma união direta do osso alveolar com a raiz (Finucane et al.¹⁰, 2003).

A reabsorção radicular externa por substituição está relacionada à ausência de células do ligamento periodontal vitais na superfície radicular (Bastos et al.⁶, 2014). Assim, na ausência de cementoblastos na superfície radicular e presença de regiões de anquilose, pelo processo de remodelação óssea fisiológica, a raiz dentária vai sendo substituída por tecido ósseo (Trope et al.³², 2011).

A ocorrência de reabsorção inflamatória, anquilose e reabsorção por substituição está diretamente relacionada a uma série de fatores, como a integridade da camada de cimento, viabilidade de células do ligamento periodontal, condições do tecido pulpar e intensidade do trauma (Carvalho et al.⁸, 2016).

Conduas têm sido realizadas na tentativa de melhorar o prognóstico nos casos de reimplantes tardios. Além do uso de um meio de armazenamento adequado até que o dente seja inserido novamente no alvéolo, tratamentos têm sido buscados na tentativa de evitar a perda posterior do dente. Um método empregado em engenharia tecidual, que visa à regeneração do periodonto, inclusive em casos de reimplantes dentários, é o uso do plasma rico em plaquetas (PRP) (Assunção et al.⁵, 2011, Nagata et al.²², 2014, Priya et al.²⁵, 2016). O PRP é uma concentração autóloga de plaquetas em um pequeno volume de plasma (Marx et al.¹⁸, 2004, Anila et al.³, 2006, Kawase et al.¹³, 2015). O PRP ativado libera fatores de crescimento (FC) cuja função é de estimular o crescimento, proliferação, cicatrização e diferenciação celular por meio da regulação de uma variedade de processos celulares (Kawase et al.¹³, 2015). Os FC iniciam a cicatrização do tecido conjuntivo, regeneração e reparação óssea e promovem o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos (Anila et al.³, 2006, Law et al.¹⁵, 2013). Os principais FC encontrados no PRP são: PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas, TGF- β - Fator de transformação do crescimento β , IGF-I - Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I, EGF - Fator de crescimento epitelial e VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular (Kawase et al.¹³, 2015).

O PDGF é um potente fator de crescimento regulatório e sinalizador que inicia quase todo o processo de cicatrização de feridas. A principal função do PDGF é estimular a replicação de células capazes de cicatrização e de células pré-mitóticas osteoprogenitoras parcialmente diferenciadas, que fazem parte da cicatrização do tecido conjuntivo e ósseo. O

PDGF também provoca a replicação das células endoteliais, formando novos capilares (Anila et al.³, 2006).

O TGF- β é um fator de crescimento de tecido conjuntivo envolvido com a formação da matriz que influencia os osteoblastos para estabelecer a matriz óssea através do processo de osteogênese. Ele regula a proliferação e diferenciação de vários tipos de células, como fibroblastos, incluindo os do ligamento periodontal, células endoteliais, osteoprogenitoras, condroprogenitoras e células-tronco mesenquimais (Anila et al.³, 2006).

O IGF-I também é importante na cicatrização de feridas e estimula tanto a proliferação quanto a função dos osteoblastos. Ele participa do desenvolvimento de muitos tecidos, incluindo os dentes e tem efeitos sobre os fibroblastos do ligamento periodontal e síntese proteica (Anila et al.³, 2006).

O EGF é responsável pela diferenciação celular e estimula a re-epitelização, a angiogênese e a atividade da colagenase. O VEGF tem potentes atividades angiogênicas, mitogênicas e de aumento da permeabilidade vascular específicas para células endoteliais, desempenhando importante papel na formação dos vasos sanguíneos (Anila et al.³, 2006).

O PRP é usado para liberar FC em altas concentrações no local onde se pretende reparar um defeito ou uma lesão tecidual, levando à aceleração do processo cicatricial (Mendonça et al.²¹, 2009). Para regeneração do periodonto, é fundamental que ocorra uma nova ligação das fibras colágenas do ligamento periodontal com a matriz orgânica da raiz dentária, sendo que a fibronectina presente no PRP, tem uma forte ação quimiotática para fibroblastos e auxilia nessa interligação (Melcher et al.²⁰, 1985). Além disso, devido a sua capacidade de estimular a proliferação celular, migração, adesão e síntese de FC a partir de células e grânulos plaquetários, o PRP apresenta um efeito positivo na regeneração do periodonto (Anitua et al.⁴, 2013).

O uso do PRP para a regeneração do ligamento periodontal após avulsão dentária foi avaliado por Assunção et al.⁵. (2011). Dentes de cães foram avulsionados, mantidos por 30 minutos em meio seco, preenchidos com hidróxido de cálcio e reimplantados no alvéolo dentário preenchido com PRP. Os resultados mostraram que, todos os grupos onde o PRP foi utilizado apresentaram menor porcentagem de reabsorção radicular inflamatória quando comparados ao grupo controle, o qual não recebeu nenhum tratamento prévio ao reimplante. Na presença de PRP, também não foram observadas regiões de anquilose.

Outra tecnologia que vem sendo estudada em casos simulados de avulsão e reimplante dentário é a terapia com laser de baixa intensidade (LBI) (Saito et al.²⁹, 2011, Vilela et al.³³, 2011, Carvalho et al.⁸, 2016, Matos et al.¹⁹, 2016). Após a ocorrência de trauma, ocorre uma resposta inflamatória a partir dos tecidos de suporte dentário agredidos, e o LBI, devido sua propriedade de modular o processo inflamatório, tem sido utilizado a fim de melhorar a recuperação tecidual e permitir o início do processo de reparo, reduzindo a reabsorção radicular externa inflamatória (Vilela et al.³³, 2011, Carvalho et al.⁸, 2016, Matos et al.¹⁹, 2016). Além disso, o LBI apresentou efeitos positivos na proliferação de fibroblastos (Saygun et al.³¹, 2008) e na adesão dessas células à superfície radicular (Raldi et al., 2010), acelerando o processo de reparo do ligamento periodontal, o que pode melhorar o prognóstico de dentes avulsionados e reimplantados. Vilela et al.³³. (2011) mostraram que o uso do LBI no ligamento periodontal e superfície radicular de incisivos superiores reimplantados de ratos leva a menor porcentagem de áreas reabsorvidas. Além disso, na presença do LBI os odontoblastos não apresentaram nenhuma mudança morfológica degenerativa e a quantidade de células inflamatórias pulpares e áreas de necrose foram menos evidentes. Estudos mais recentes também demonstraram que o LBI favoreceu o processo de reparo, aumentando o perímetro de reparo periodontal e reduzindo a reabsorção radicular (Carvalho et al.⁸, 2016, Matos et al.¹⁹, 2016).

O LBI pode desempenhar um papel importante na regeneração do periodonto pelo aumento da produção de fatores de crescimento, como PDGF e TGF- β , que são os FC mais importantes para o ligamento periodontal. A irradiação com LBI também induz a degranulação plaquetária e a liberação de substâncias armazenadas em grânulos plaquetários específicos. Portanto, é possível que a associação do PRP ao LBI possa aumentar a concentração de fatores de crescimento no local de cicatrização da lesão (Nagata et al.²², 2014). Nagata et al.²². (2014) avaliaram a influência do PRP, LBI e sua associação na cicatrização de defeitos periodontais criados na mandíbula de ratos. Após 30 dias, nos grupos onde esses três tratamentos foram realizados, observaram que houve significativa formação de cemento e de ligamento periodontal funcional caracterizado pela inserção de fibras colágenas oblíquas e perpendiculares à superfície radicular.

O mecanismo biomolecular de reabsorção radicular tem sido estudado através da avaliação da fosfatase ácida resistente ao tartarato - TRAP (Manfrin et al.¹⁶, 2013). A TRAP é uma isoenzima de fosfatase ácida sintetizada por odontoclastos e osteoclastos, e é encontrada principalmente no tecido ósseo e em algumas células do sangue. Ela apresenta um papel importante nos processos de reabsorção, atuando como um marcador enzimático que demonstra a atividade osteoclástica (Assunção et al.⁵, 2011, Saito et al.²⁹, 2011).

Além das análises histomorfológica e histoquímica, a avaliação das reabsorções dentárias por microtomografia computadorizada (micro-CT) vem ganhando destaque dentre os estudos, e pode auxiliar na compreensão dos eventos biológicos que ocorrem após o implante dentário (Furfaro et al.¹¹, 2014, Marão et al.¹⁷, 2016). Furfaro et al.¹¹, (2014) avaliaram molares de ratos reimplantados por meio da micro-CT e observaram redução no comprimento e volume total das raízes, e na altura e volume do osso alveolar inter-radicular. Essa é uma técnica que apresenta alta precisão e permite a partir da análise bi e tridimensional dos espécimes em múltiplos planos (Kalatzis-Sousa et al.¹², 2016).

Em vista disso, torna-se oportuno avaliar, por meio de análise histológica, histoquímica (TRAP) e por micro-CT, os efeitos da laserterapia, da aplicação do PRP e associação de ambos sobre o reimplante tardio de incisivos superiores de ratos, de acordo com diferentes protocolos de tratamento.

2 PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente estudo foram:

2.1 Objetivo Geral

O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da laserterapia, da aplicação do PRP no canal radicular e no alvéolo e da associação de ambos na incidência de reabsorções radiculares 30 dias após reimplantes tardios de incisivos superiores de ratos.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar, em incisivos superiores de ratos, 30 dias após o reimplante tardio, os efeitos da laserterapia, da aplicação do PRP e da associação de ambos:

- (1) sobre a incidência de reabsorções radiculares, por meio da análise micro-CT
- (2) sobre a incidência de reabsorções radiculares, por meio da análise histológica
- (3) sobre a incidência do número de clastos por mm de superfície radicular reabsorvida, por meio da análise histoquímica.

3 PUBLICAÇÃO 1

Avaliação histológica e histoquímica do efeito da laserterapia e do plasma rico em plaquetas em reimplante dentário tardio*.

RESUMO

Novas terapias têm sido buscadas com o intuito de melhorar o reparo de dentes reimplantados. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar, por meio de análise histológica e histoquímica, os efeitos do laser de baixa intensidade (LBI), do plasma rico em plaquetas (PRP) e da associação de ambos sobre incisivos de ratos reimplantados tardiamente. Cinquenta ratos Holtzman adultos foram divididos em dez grupos experimentais (n=5): grupo controle onde o incisivo superior direito não recebeu alguma intervenção, e nove grupos onde houve a extração dentária simulando uma avulsão seguida do reimplante. Após exodontia, os incisivos superiores direitos foram mantidos no leite por 40 minutos. Em um grupo, a polpa foi mantida no canal radicular, e nos demais a polpa foi removida e o canal radicular foi preenchido com hidróxido de cálcio (HC) ou PRP. No alvéolo dentário foi aplicado o PRP ou foi mantido o coágulo (Co). Em seguida, foi realizada ou não irradiação com LBI no dente e no alvéolo, e o dente foi reimplantado. A porcentagem de reabsorção radicular e do nº de clastos/mm de superfície reabsorvida foram obtidos após 30 dias e os dados submetidos aos testes de Kruskal Wallis e Dunn ($\alpha = 0,05$). Os resultados mostraram que os grupos HC/PRP, HC/PRP/Laser, PRP/Coágulo/Laser, PRP/PRP, PRP/PRP/Laser apresentaram menor porcentagem de superfície reabsorvida em relação ao grupo HC/Co, com diferenças estatisticamente significantes. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos quanto ao número de clastos/mm de superfície reabsorvida. Pode-se concluir que a inserção do PRP no alvéolo, independentemente da associação ao laser ou do tratamento intracanal, sempre ofereceu índices de reabsorção menores que o grupo com coágulo no alvéolo e hidróxido de cálcio intracanal.

Palavras chave: Reimplante dentário, Plasma rico em plaquetas, Terapia com luz de baixa intensidade.

*Artigo escrito segundo as normas do periódico *Dental Traumatology*

INTRODUÇÃO

A avulsão de dentes permanentes é uma das decorrências mais graves de um traumatismo orofacial (1), sendo que os dentes anteriores superiores geralmente são os mais atingidos. Com o passar do tempo, a complicação mais frequente encontrada em casos de dentes avulsionados e reimplantados é a reabsorção radicular externa (2) e ela é decorrente da perda progressiva de dentina e cemento devido a ação contínua de células clásticas (3).

Para evitar ou minimizar a ocorrência de reabsorções radiculares, o reimplante imediato de dentes avulsionados é o tratamento ideal. No entanto, não é o que ocorre com maior frequência em casos de avulsões dentárias, sendo o reimplante tardio a conduta mais realizada. Assim, o tempo que o dente permaneceu fora do alvéolo e o meio de armazenamento que o dente foi acondicionado, a contaminação microbiana e o estágio de formação da raiz são fatores que levam a reabsorção radicular externa (4).

Em casos de reimplantes tardios, quando é realizado a partir de 5 minutos após a avulsão (5), é aconselhável que o dente permaneça em um meio de armazenamento capaz de manter a viabilidade das células do ligamento periodontal (1,6). Indicado como eficaz meio de armazenamento para o dente avulsionado, o leite tem mostrado bons resultados na manutenção da viabilidade das células do ligamento periodontal, além de ser mais comumente encontrado próximo ao local do acidente (6-8).

Além do uso de um meio de transporte adequado até que o elemento dentário seja inserido novamente no alvéolo, tratamentos têm sido buscados na tentativa de melhorar o prognóstico nos casos de reimplantes tardios e evitar a perda posterior do dente.

Estudos têm avaliado o uso da terapia com laser de baixa intensidade (LBI) em casos simulados de avulsão e reimplante dentário, devido a sua propriedade de modular o processo inflamatório e diminuir a reabsorção radicular externa (2,9). Vilela et al. (9) avaliaram, por

meio de análise histológica, o efeito do LBI no dente e ligamento periodontal de incisivos superiores de ratos após o reimplante e observaram que o grupo que recebeu irradiação apresentou menor porcentagem de áreas reabsorvidas.

Outro tratamento que tem sido estudado nos casos de reimplante dentário é o uso do plasma rico em plaquetas - PRP (10). O PRP é uma concentração autóloga de plaquetas em um pequeno volume de plasma (11). Ele é capaz de estimular a proliferação celular, migração, adesão e síntese de diversos fatores de crescimento a partir de células e grânulos plaquetários, tendo um efeito positivo na regeneração do periodonto (12). O PRP é usado para liberar fatores de crescimento (FC) em altas concentrações no local onde se pretende reparar um defeito ou uma lesão tecidual, levando à aceleração do processo cicatricial (13).

Há relato de que a indução à degranulação plaquetária e à liberação de substâncias armazenadas em grânulos plaquetários específicos (14), bem como o estímulo à produção de fatores de crescimento (15) podem ser determinados pela irradiação com LBI. Portanto, é possível que a associação do PRP ao LBI possa aumentar a concentração de fatores de crescimento no local de cicatrização da lesão (16), sendo importante para o reparo do ligamento periodontal em casos de reimplante dentário tardio.

O efeito do PRP, LBI e sua associação na cicatrização de defeitos periodontais criados na mandíbula de ratos foram avaliados. Após 30 dias, nos grupos onde esses três tratamentos foram realizados, observaram que houve significativa formação de cemento e de ligamento periodontal funcional caracterizado pela inserção de fibras colágenas oblíquas e perpendiculares à superfície radicular. No entanto, não houve diferença entre o uso do PRP e do LBI isoladamente ou associados (16).

Vários estudos sobre reimplante dentário têm utilizado métodos histológicos, com análises morfológicas e morfométricas das regiões de reabsorção radicular. Além disso, o mecanismo biomolecular de reabsorção radicular tem sido estudado por meio da avaliação da

fosfatase ácida resistente ao tartarato - TRAP (17). O TRAP é uma isoenzima de fosfatase ácida encontrada principalmente no tecido ósseo e em algumas células do sangue. Ela apresenta um papel importante nos processos de reabsorção, atuando como um marcador enzimático que demonstra a atividade osteoclástica (18).

O objetivo desse estudo foi avaliar, por meio de análise histológica e histoquímica, os efeitos da irradiação com LBI, da aplicação do PRP e da associação de ambos no reimplante tardio de incisivos superiores de ratos, diante da hipótese de que a laserterapia e o PRP podem atuar de maneira positiva no tratamento de dentes avulsionados e reimplantados.

MATERIAL E MÉTODO

Todos os procedimentos em animais estão de acordo com as diretrizes éticas e regulamentação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara-FOAr, que aprovou o Projeto (Processo CEUA nº 46/2014 – ANEXO A). Foram utilizados 50 ratos machos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Holtzman) pesando entre 250g e 280g, fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Araraquara – UNESP. Durante todo o período experimental os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, em gaiolas de polietileno, com alimentação macia (polenta em temperatura ambiente) e ração granulada triturada durante 07 dias após os procedimentos cirúrgicos e sólida nos demais períodos, água *ad libitum*, temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ($55\pm 10\%$) controladas e fotoperíodo de 12 horas.

Coleta de sangue para obtenção do Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

Os animais foram anestesiados por meio de injeção intramuscular de cloridrato de xilazina 2% (0,04 mL/100g de peso corporal) (Anasedan, Agribands do Brasil Ltda, Paulínia, SP, Brasil) associado ao cloridrato de ketamina 10% (0,08 mL/100g de peso corporal) (Dopalen, Agribands do Brasil Ltda, Paulínia, SP, Brasil). Em seguida, os animais foram submetidos à canulação da veia jugular para a coleta de 4 mL de sangue autólogo utilizando um dispositivo “butterfly” acoplado a um tubo plástico contendo 0,22 mL de citrato de sódio a 3,2% para prevenir a coagulação (APÊNDICE A – Fig. A.1). A cânula foi removida da veia jugular e os tecidos foram reposicionados e suturados utilizando-se fio de seda (Seda 4-0, ETHICON, São José dos Campos, SP-Brasil). Cada amostra de sangue permaneceu em temperatura ambiente até a realização da exodontia do incisivo superior direito (descrita abaixo) e foi processada durante a permanência do dente no meio de armazenamento/leite.

Procedimento cirúrgico – exodontia do incisivo superior direito

Imediatamente após a coleta de sangue, com os animais sob anestesia, foi realizada antissepsia da região frontal da maxila com digluconato de clorexidina 2% (FGM produtos odontológicos; Joinville, Santa Catarina, Brasil). Com o animal posicionado em decúbito dorsal foi realizada a extração do incisivo superior direito de maneira mais atraumática possível, empregando-se cureta de dentina nº05 para sindesmotomia, holleback 3S e gengivótomo para luxação e pinça hemostática adaptada para extração (19) (APÊNDICE A – Fig. A.2).

Após a extração, os incisivos permaneceram em 5 mL de leite desnatado (Parmalat Brasil S/A Indústria de alimentos; Jundiaí, SP, Brasil) em temperatura ambiente por 40 minutos, representando o reimplante dentário tardio. Após esse período, os dentes foram lavados com soro fisiológico estéril e a papila dentária e o órgão do esmalte foram removidos com uma lâmina de bisturi número 15. Em seguida, os dentes e seus respectivos alvéolos

foram submetidos aos protocolos de tratamento descritos no item “grupos experimentais”, e reimplantados.

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais receberam, por via intramuscular, uma dose única de 24.000 UI de Pentabiótico pequeno porte (Benzilpenicilina benzatina-12.000 UI, Benzilpenicilina procaína- 6.000 UI, Benzilpenicilina potássica- 6.000 UI, Sulfato de Diidroestreptomicina- 5 mg, Sulfato de Estreptomicina- 5 mg) (Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil), e foi administrado, por via oral, 0,03mg de dipirona sódica por 100g de peso corpóreo nos três primeiros dias. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, devidamente identificados de acordo com o grupo experimental, sendo observados até a recuperação da anestesia e diariamente.

Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dez grupos experimentais (n=5), de acordo com o protocolo de tratamento que o dente e o alvéolo receberam antes do reimplante. Os grupos e períodos experimentais podem ser observados na tabela 1 a partir da seguinte descrição:

1. Grupo P/Co: a polpa foi mantida no canal radicular e o alvéolo dentário foi irrigado com soro fisiológico estéril.
2. Grupo HC/Co: por via retrógrada, a polpa dentária foi removida com auxílio de uma lima tipo Hedstroen nº35 pré-curvada (DentsplyMaileffer, Ballaigues, Suíça), o canal foi irrigado com soro fisiológico estéril, seco com pontas de papel absorvente e preenchido com hidróxido de cálcio (Ultracal, Ultradent, South Jordan, UT, EUA) e o alvéolo dentário foi irrigado com soro fisiológico estéril.
3. Grupo HC/Co/L: procedimento semelhante ao grupo HC/Co, porém com irradiação pelo LBI.

4. Grupo HC/PRP: por via retrógrada, a polpa dentária foi removida com auxílio de uma lima tipo Hedstroen nº35 pré-curvada, o canal foi irrigado com soro fisiológico estéril, seco com pontas de papel absorvente e preenchido com hidróxido de cálcio e o alvéolo dentário foi irrigado com soro fisiológico estéril e preenchido com PRP.
5. Grupo HC/PRP/L: procedimento semelhante ao grupo HC/PRP, porém com irradiação pelo LBI.
6. Grupo PRP/Co: por via retrógrada, a polpa dentária foi removida com auxílio de uma lima tipo Hedstroen nº35 pré-curvada, o canal foi irrigado com soro fisiológico estéril, seco com pontas de papel absorvente e preenchido com PRP, o alvéolo foi irrigado com soro fisiológico estéril.
7. Grupo PRP/Co/L: semelhante ao grupo PRP/Co, porém com irradiação pelo LBI.
8. Grupo PRP/PRP: por via retrógrada, a polpa dentária foi removida com auxílio de uma lima tipo Hedstroen nº35 pré-curvada, o canal foi irrigado com soro fisiológico estéril, seco com pontas de papel absorvente e preenchido com PRP, e o alvéolo dentário foi irrigado com soro fisiológico estéril e preenchido com PRP.
9. Grupo PRP/PRP/L: semelhante ao grupo PRP/PRP, porém com irradiação pelo LBI.
10. Grupo Controle: não foi realizada nenhuma intervenção. Para este grupo, não pode ser utilizado o dente homólogo ao que recebeu os tratamentos descritos pois pode ocorrer interferência do LBI e/ou do PRP.

Tabela 1: Grupos experimentais de acordo com o tratamento realizado.

Grupos experimentais	Preenchimento do canal radicular	Tratamento do Periodonto/ Alvéolo	Irradiação com LBI
<i>Po/Co</i>	Polpa	Coágulo	-
<i>HC/Co</i>	Hidróxido de cálcio	Coágulo	-
<i>HC/Co/L</i>			+
<i>HC/PRP</i>		PRP	-
<i>HC/PRP/L</i>			+
<i>PRP/Co</i>	PRP	Coágulo	-
<i>PRP/Co/L</i>			+
<i>PRP/PRP</i>		PRP	-
<i>PRP/PRP/L</i>			+
<i>Controle</i>	Não foi realizada intervenção		

Po, polpa; Co, coágulo; HC, hidróxido de cálcio; PRP, plasma rico em plaquetas; L, laser de baixa intensidade; +, irradiação com LBI; -, ausência de irradiação com LBI.

Preparo do PRP e Contagem das plaquetas

Para a obtenção do PRP, a partir da coleta inicial, 2 mL de sangue foram colocados em um tubo plástico (ependorf) e foram centrifugados por 7 minutos a 1200 rpm, a 22°C. O volume total de PRP obtido após centrifugação foi transferido para outro tubo plástico e utilizado para o tratamento do alvéolo dentário ou preenchimento do canal radicular e para contagem das plaquetas (APÊNDICE A – Fig. A.3). Para o preenchimento do alvéolo e do canal radicular, 500 µL de PRP foram ativados com 25 µL de cloreto de cálcio a 10% e em seguida, 25 µL de PRP ativado foram inseridos no alvéolo e o canal radicular foi completamente preenchido via retrógrada empregando uma ponta flexível acoplada a uma pipeta. A contagem das plaquetas foi realizada manualmente em câmara de Neubauer a partir de 10 µL de PRP diluídos em 1990 µL de oxalato de amônio a 1%. As plaquetas exibiram

morfologia normal. A média da contagem de plaquetas no PRP foi de $141,4 \pm 56,73 \times 10^4$ plaquetas/mL.

Protocolo de irradiação com LBI

Foi utilizado o laser de baixa intensidade infravermelho Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs) com comprimento de onda de 808nm – TF Premier Plus (MM Optics, São Carlos, SP, Brasil). Foram realizadas três irradiações de modo contínuo e pontual, com potência de 10 mW. Primeiramente, após o preenchimento do canal radicular com HC ou com PRP, o LBI foi aplicado nos terços médio e apical da raiz por 7,2 segundos e densidade de energia de $2,4 \text{ J/cm}^2$ em cada ponto, totalizando $4,8 \text{ J/cm}^2$ na superfície radicular. Em seguida, foi feita aplicação na embocadura do alvéolo por 14,4 segundos e densidade de energia de $4,8 \text{ J/cm}^2$. Após a irradiação com LBI, os dentes foram reimplantados.

Processamento histotécnico

Trinta dias após o reimplante dentário, os animais foram anestesiados e foram submetidos à eutanásia com sobredose de anestésico. As maxilas foram removidas e as peças obtidas foram imediatamente acondicionadas em recipientes com solução de formaldeído a 4% tamponado com fosfato de sódio 0,1 M com pH 7,2, por 48 horas. Após a fixação, as peças foram reduzidas de acordo com a região de interesse por meio de uma máquina de corte Isomet 1000 (Buehler Ltda, Lake Bluff, IL, EUA), obtendo-se somente a região anterior da maxila. Em seguida, para obtenção do terço médio da porção radicular do incisivo superior direito, com uma lâmina de bisturi nº 15, dividiu-se o dente em três partes: terço cervical, medindo 2,5 mm, com a margem superior demarcada a partir da margem gengival no terço cervical do dente; terço médio, medindo 3,0 mm a partir da porção inferior do terço cervical, e terço apical, abrangendo o restante do dente a partir da margem inferior do terço médio. Os espécimes obtidos foram descalcificados em uma solução de EDTA a 4,3% tamponado com

fosfato de sódio 0,1M com pH 7,2. Em seguida, as peças foram desidratadas a partir de sucessivas passagens em soluções alcoólicas, a partir do álcool 70°GL até o álcool absoluto, e posteriormente diafanizadas em xilol. Foi realizada a inclusão em parafina para a obtenção de blocos com fragmentos do terço médio da raiz do incisivo superior direito. Os blocos do terço médio radicular foram cortados em micrótomo e foram obtidos cortes transversais de 6 µm de espessura abrangendo a região do terço médio radicular e tecidos adjacentes . Apenas o terço médio radicular contendo cimento foi examinado, uma vez que há interferência dos instrumentos no terço cervical durante a exodontia, e da lâmina de bisturi no terço apical durante a remoção da papila dentária e órgão do esmalte. Além disso, foi analisada a face palatina devido à presença de ligamento periodontal apenas nesta face, já que a face vestibular do incisivo de ratos apresenta-se recoberta por esmalte em toda sua extensão (6,7).

Análise morfológica

Cortes do terço médio do incisivo superior direito foram corados com Hematoxilina & Eosina (H&E). Estes cortes foram utilizados para a descrição morfológica dos tecidos circundantes à superfície radicular.

Para a análise morfológica, imagens dos cortes histológicos do terço médio da raiz foram obtidas utilizando uma câmera fotográfica digital (DP-71, Olympus, Japão) acoplada a um microscópio de luz (BX-51, Olympus, Japão) e a análise das imagens foi realizada utilizando um programa de análise de imagens (Image-Pro Express 6.0, Olympus – Japão).

Reação histoquímica para a atividade da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e Análise morfométrica

A atividade da enzima TRAP foi utilizada para a marcação de clastos (odontoclastos e cementoclastos). Os cortes da maxila contendo o incisivo superior direito foram submetidos à reação do TRAP a fim de verificar o processo de reabsorção dentinária e cementária. Para cada animal, foram utilizados dois cortes não seriados representativos do terço médio da raiz do incisivo superior direito. Os cortes foram desparafinizados e incubados em uma solução de 150 mL de tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 5,0, acrescido de 210 mg de “FastRed Salt TR” (Sigma-Aldrich, Chemical Company, Saint Louis, MO, EUA) e 30 mg de naftol AS-BI (Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO, EUA), previamente dissolvido em 1 mL de N-dimetilformamida (Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO, EUA); a esta solução adicionou-se tartarato de sódio 50 mM. Em seguida, a solução final foi filtrada, os cortes foram imersos nessa solução e incubados à 39°C por aproximadamente 9 horas. Após a incubação, os cortes foram lavados em água destilada, contracorados com hematoxilina de Carazzi e montados em meio aquoso (glicerina). Como controle de especificidade, alguns cortes foram incubados na ausência de naftol AS-BI.

O perímetro das lacunas de reabsorção radicular presentes no terço médio da raiz foi mensurado com o auxílio de um sistema de análise de imagens (Image-Pro Express 6.0, Olympus). O perímetro total da superfície radicular recoberta por cimento e o perímetro de cada superfície radicular reabsorvida foram mensurados em micrometros e convertidos em porcentagem para análise estatística. A porcentagem de superfície radicular reabsorvida foi obtida por meio da fórmula: % Superfície reabsorvida = $\frac{\text{Perímetro da superfície reabsorvida}}{\text{Perímetro total}} \times 100$.

A contagem do número de células TRAP-positivas presentes na superfície das lacunas de reabsorção do terço médio radicular foi realizada utilizando-se um microscópio de luz

convencional em aumento de 40x. Em cada espécime, o número de clastos foi expresso de acordo com o número de células/mm de superfície reabsorvida.

Todas as medidas foram realizadas em dois momentos distintos por um avaliador previamente calibrado que desconhecia o tratamento realizado nos espécimes. Os dados obtidos foram analisados por meio dos programas estatísticos Graph Pad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA.). Os testes de Kruskal Wallis e Dunn foram utilizados para comparar a reabsorção radicular e o número de células TRAP-positivas por mm de superfície reabsorvida entre os grupos. Foi adotado o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

ANÁLISE MORFOMÉTRICA E MORFOLÓGICA

Análise morfométrica

Os resultados mostraram que os grupos HC/PRP, HC/PRP/L, PRP/Co/L, PRP/PRP, PRP/PRP/L apresentaram menor perímetro de superfície reabsorvida em relação ao grupo HC/Co, com diferenças estatisticamente significantes (Figura 1).

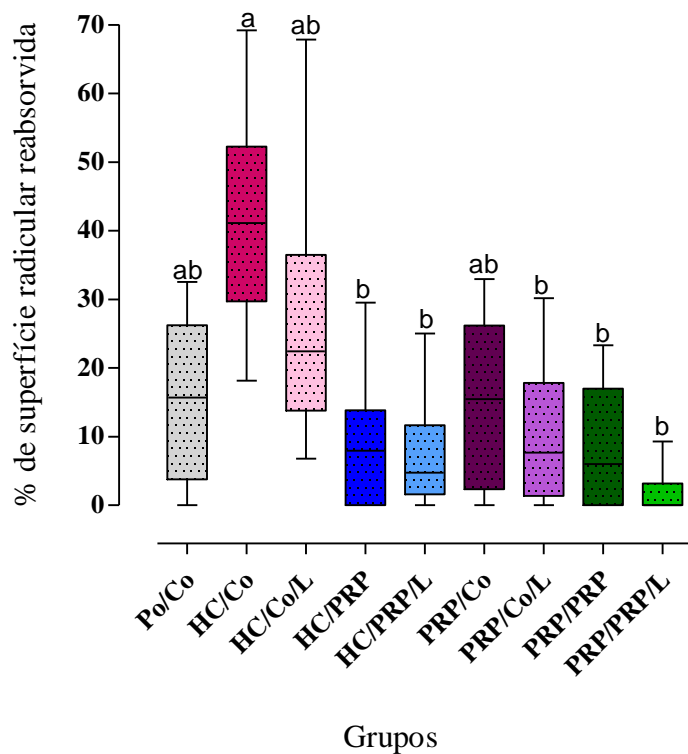


Figura 1 - Medianas e respectivos desvios padrão da porcentagem de superfície radicular reabsorvida. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Po, polpa; Co, coágulo; HC, hidróxido de cálcio; PRP, plasma rico em plaquetas; L, laser de baixa intensidade.

Em relação ao número de células TRAP positivas presentes nas lacunas de reabsorção radicular no terço médio da raiz, os resultados encontrados mostraram a presença de clastos em todos os grupos experimentais, sem diferença entre o número de células presente para cada grupo (Figura 2).

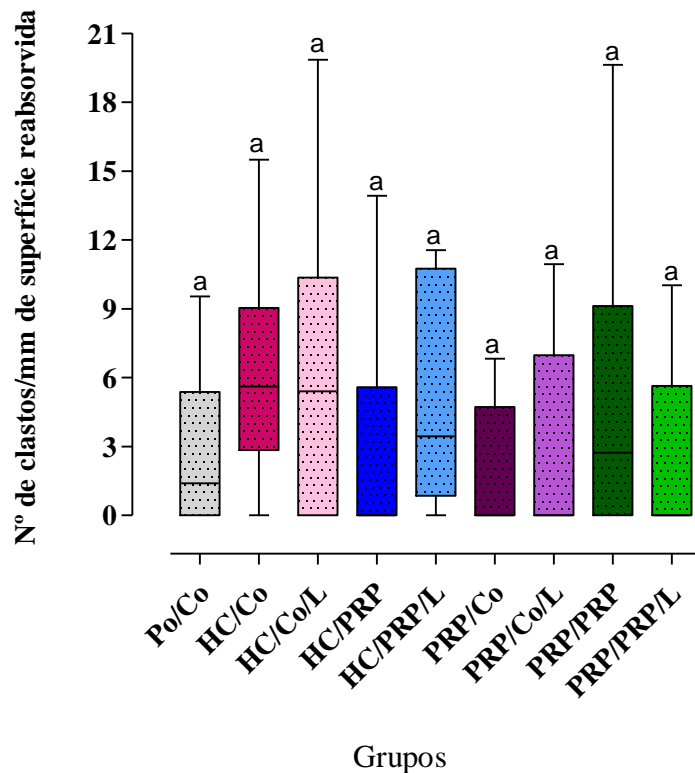


Figura 2 – Medianas e respectivos desvios padrão do número de clastos/mm de superfície radicular reabsorvida. Letras iguais indicam semelhança estatística entre os grupos ($p < 0,05$). Po, polpa; Co, coágulo; HC, hidróxido de cálcio; PRP, plasma rico em plaquetas; L, laser de baixa intensidade.

Análise morfológica

A análise descritiva foi realizada após avaliação do ligamento periodontal, cimento, dentina e parede alveolar 30 dias após o reimplante dentário.

- Grupo Controle

Os incisivos centrais superiores direitos que não foram submetidos a nenhuma intervenção, Grupo Controle (GC), apresentaram suas estruturas normais. O ligamento periodontal ocupava estreito espaço entre a superfície externa da raiz e a superfície óssea do processo alveolar. Uma camada contínua de cimento acelular revestia toda a superfície externa da dentina, exceto na região ocupada pelo esmalte. Internamente, a dentina estava revestida por uma camada odontoblástica regular. O tecido pulpar apresentou-se íntegro e com inúmeros vasos sanguíneos (Fig. 3A). Foi observada integridade da superfície radicular e do cimento em toda sua extensão.

- Grupo Po/Co

Em todos os espécimes do grupo Po/co, a polpa radicular estava parcialmente necrosada e o espaço do ligamento periodontal preenchido quase totalmente com ligamento periodontal, além da presença de inúmeras células inflamatórias (Fig. 3B). O cimento e a dentina apresentaram áreas de reabsorção inflamatória (Fig. 3E).

- Grupo HC/Co

A análise morfológica mostrou a presença de ligamento periodontal em poucas áreas adjacentes à raiz. A raiz encontra-se, em sua maior extensão, circundada por trabéculas ósseas justapostas a superfície cementária (Figs. 3C e 3F). Em apenas um animal foi observada reabsorção radicular inflamatória profunda, que se estendia desde região cementária até

próximo do canal radicular. Foram observadas inúmeras células inflamatórias próximas ao espaço do esmalte e em algumas regiões adjacentes à face palatina da raiz.

- Grupo HC/Co/L

A reabsorção radicular inflamatória foi presente em todos espécimes desse grupo. As áreas reabsorvidas eram de pequena profundidade e maior número e estavam preenchidas com inúmeras células inflamatórias. O espaço periodontal também estava preenchido por infiltrado inflamatório (Figs. 3D e 3G)

- Grupo HC/PRP

Em 2 espécimes, foi observada a presença de ligamento periodontal com numerosas células inflamatórias e de trabéculas ósseas delgadas e irregulares. Foram encontrados alguns pontos de reabsorção superficiais (Fig. 4A). Em 3 espécimes foi observado um espaço vazio entre a superfície externa radicular e o espaço periodontal. O espaço periodontal estava preenchido por infiltrado inflamatório. Na superfície radicular adjacente ao espaço vazio, não foram encontradas regiões de reabsorção. Nas demais regiões da superfície radicular, foram observadas áreas reabsorvidas de pequena extensão, com pouco comprometimento em profundidade (Fig. 4B).

- Grupo HC/PRP/L

Nesse grupo, a maioria dos espécimes apresentou o espaço periodontal ocupado em sua maior extensão por ligamento periodontal. A superfície radicular apresentou-se com diversas lacunas superficiais de reabsorção (Fig. 4C). Nos demais espécimes, o espaço periodontal estava ocupado em sua maior extensão por tecido conjuntivo. Foi observado um espaço vazio entre a superfície externa radicular e o espaço periodontal. Na superfície

radicular adjacente ao espaço vazio, não foram encontradas regiões de reabsorção. Nas demais regiões da superfície radicular, foram observadas lacunas de pequena extensão, porém mais profundas (Fig. 4D).

- Grupo PRP/Co

Presença de ligamento periodontal na maior parte da raiz dentária com células inflamatórias. Presença de áreas de reabsorção superficiais, quando não foi observado PRP no interior do canal após os 30 dias (Figs. 5A e 5C), ou ausentes, na presença de remanescentes do PRP dentro do canal radicular (Figs. 5B e 5 D).

- Grupo PRP/Co/L

Na maioria dos espécimes o espaço periodontal estava ocupado por ligamento periodontal (Fig. 5E). Em dois espécimes foram observadas pequenas áreas de reabsorção radicular com presença de células inflamatórias.

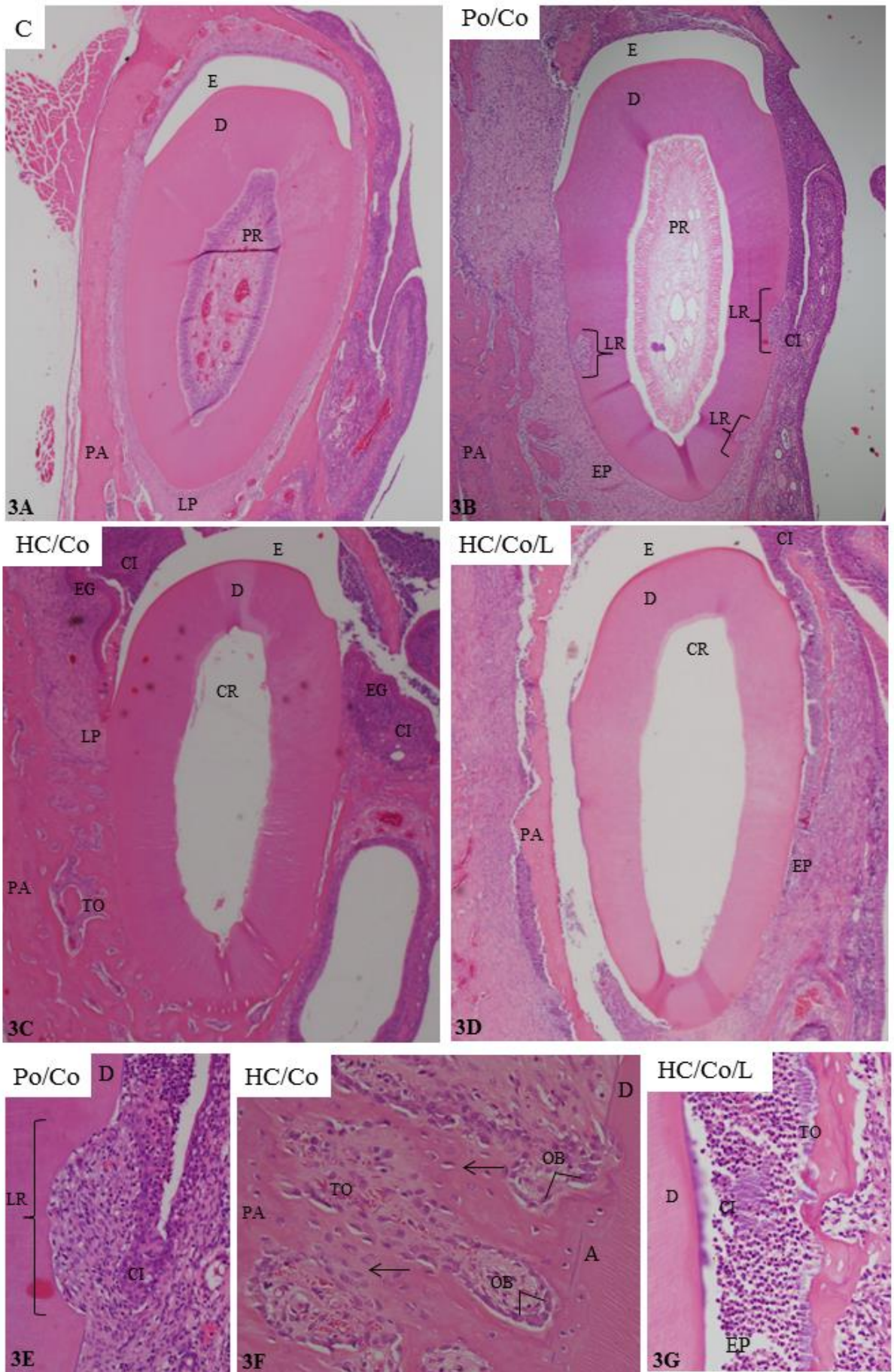
- Grupo PRP/PRP

Em dois espécimes foram observadas pequenas áreas de reabsorção radicular com presença de células inflamatórias. Nos demais, o espaço periodontal estava ocupado por ligamento periodontal (Fig. 6A). As fibras do ligamento periodontal apresentaram-se dispostas de forma oblíqua em relação à superfície radicular, com presença de inúmeros vasos sanguíneos (Fig. 6B).

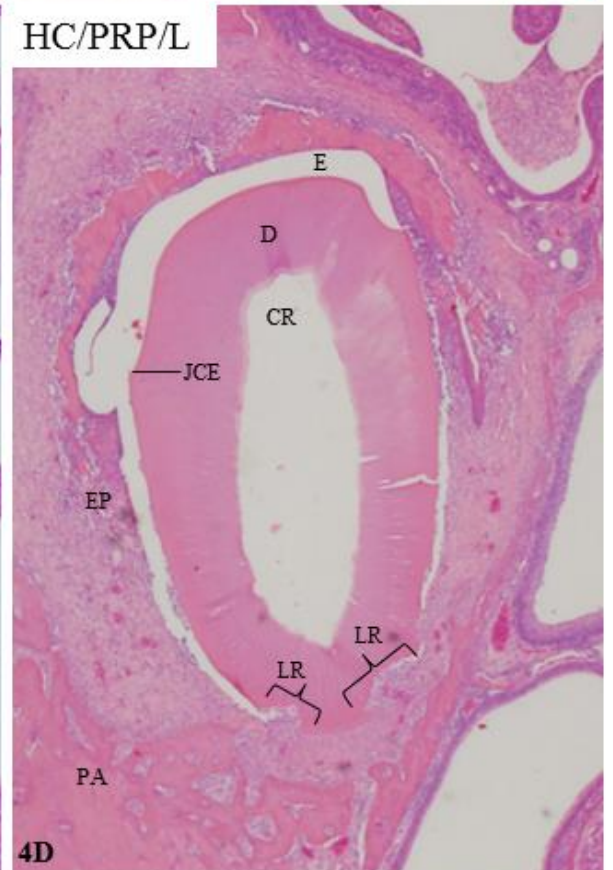
- Grupo PRP/PRP/L

O espaço periodontal (EP) apresentou-se preenchido em sua maior extensão por ligamento periodontal com células inflamatórias; além disso, pequenas áreas de reabsorção na superfície radicular também foram observadas (Figs. 6C e 6D).

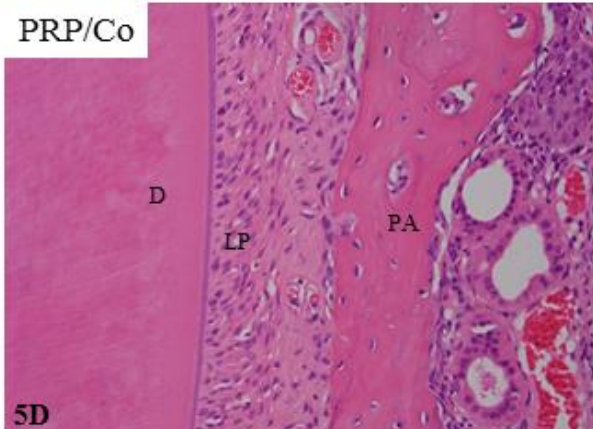
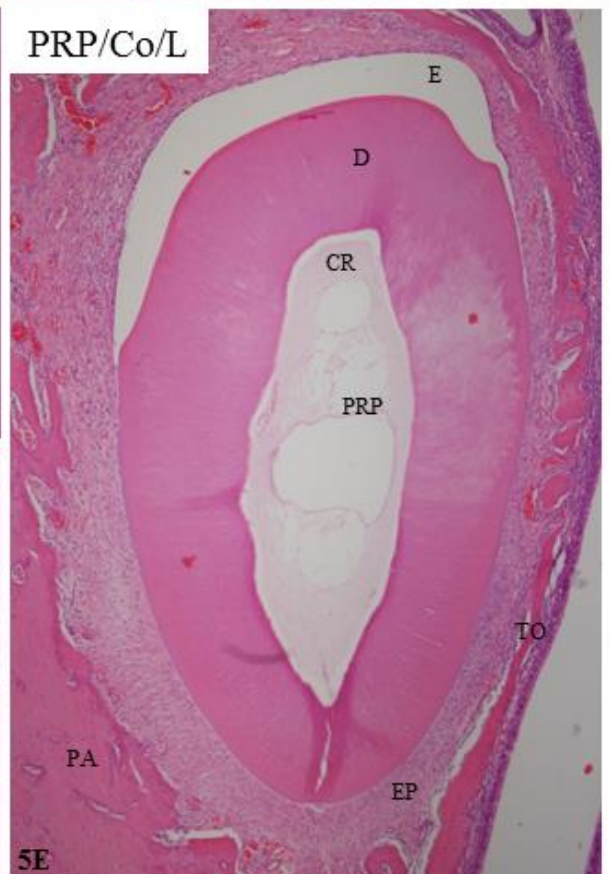
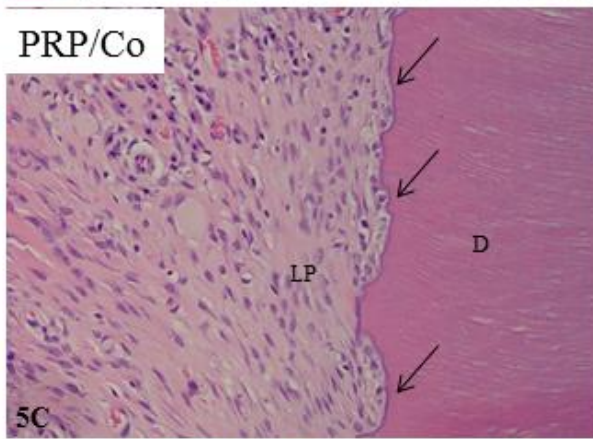
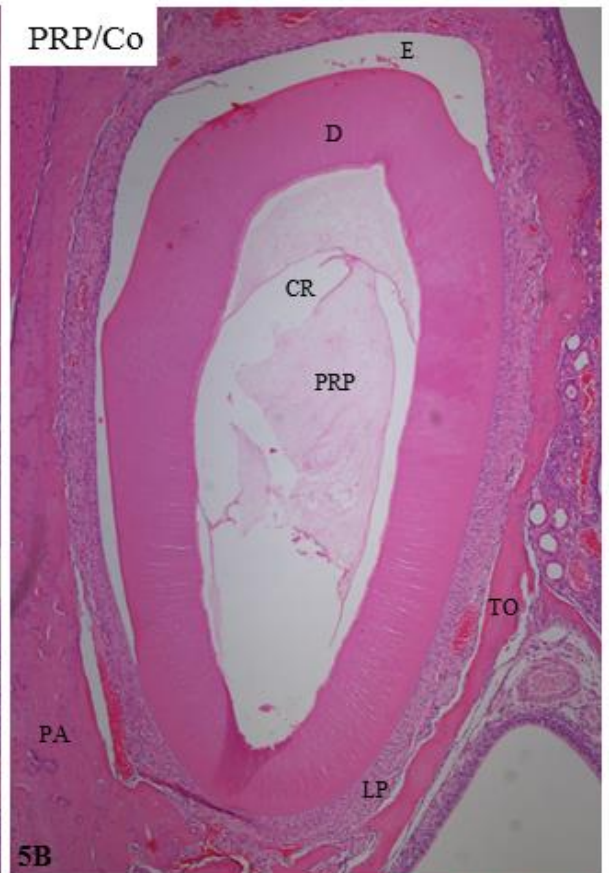
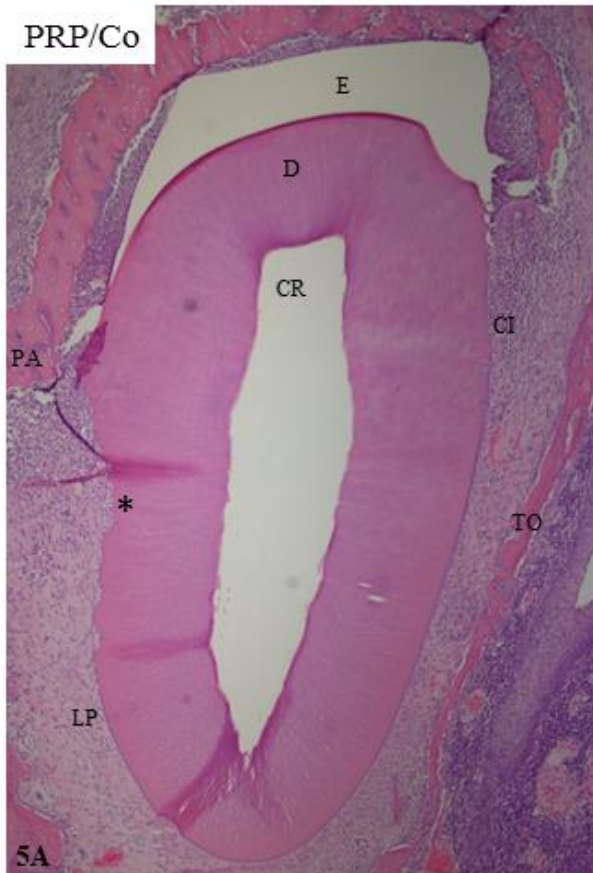
Em todos os grupos experimentais, as marcações para a proteína TRAP demarcando as células clásticas foram visualizadas de forma semelhante (Figs. 7A e 7B)



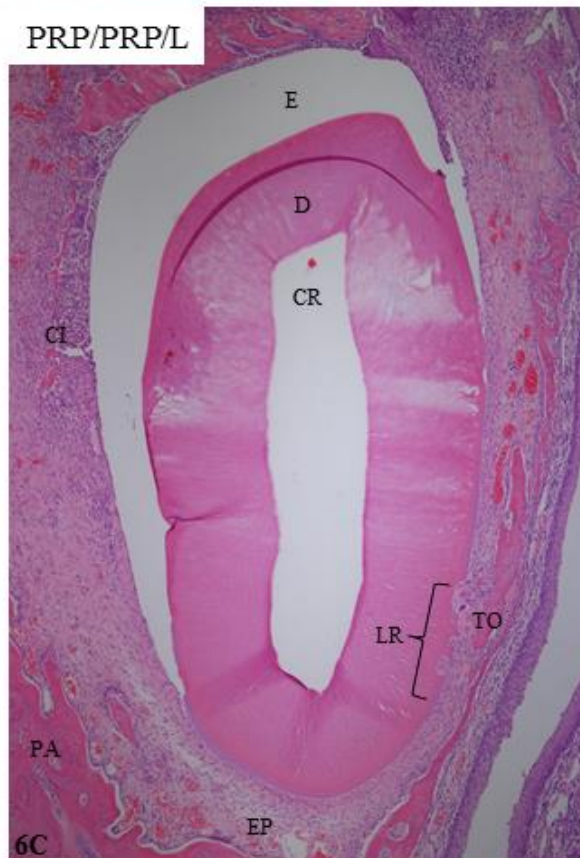
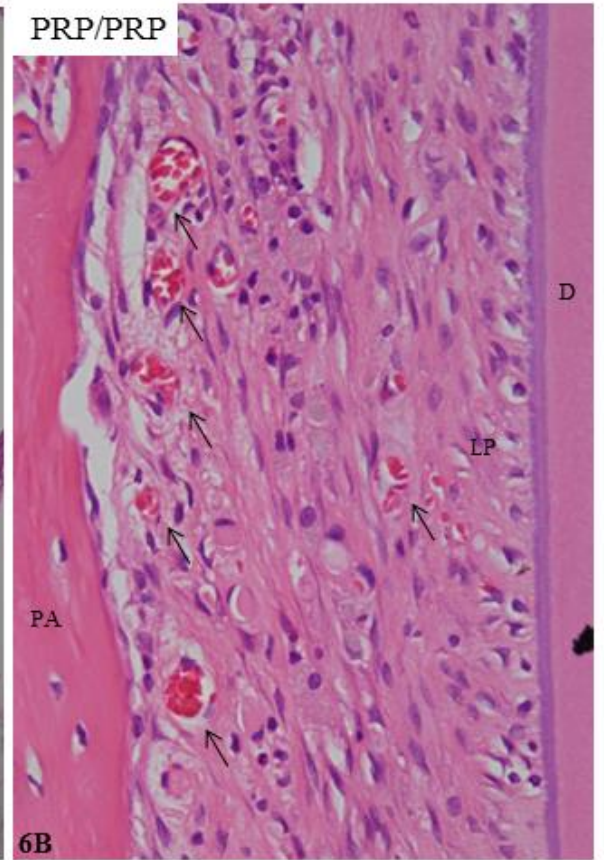
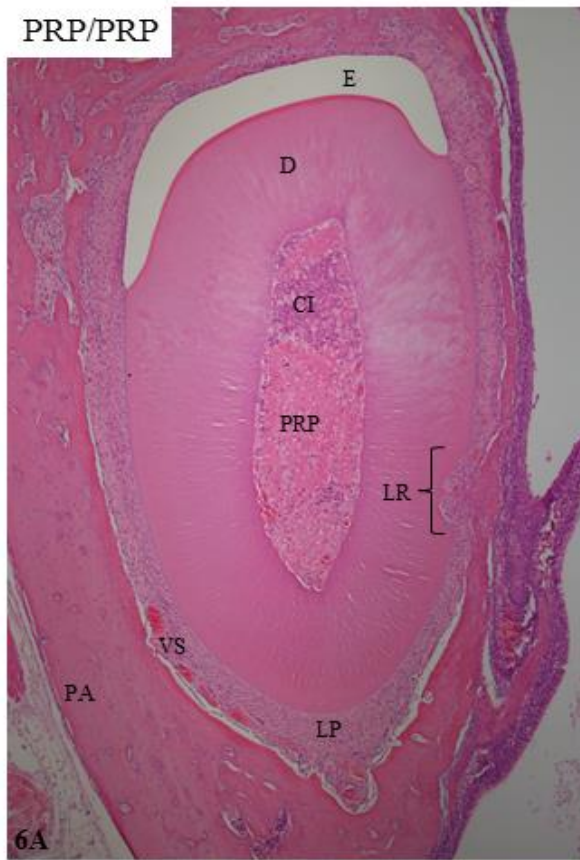
Figuras 3A-3G – Fotomicrografias mostrando cortes transversais da porção média de raízes de incisivos superiores direitos de ratos. **Fig. 3A** (grupo controle - C) - observa-se a polpa radicular (PR), dentina (D), o espaço do esmalte (E) localizado na face vestibular, o ligamento periodontal (LP) presente entre a superfície externa da raiz e a superfície do processo alveolar (PA) H&E (28,5x). **Fig. 3B** (grupo polpa/coágulo – Po/Co) - observa-se a polpa radicular parcialmente necrosada (PR), dentina (D), o espaço do esmalte (E) localizado na face vestibular, espaço periodontal (EP), infiltrado inflamatório (CI) e na face palatina, mesial e distal, lacunas de reabsorção (LR) são observadas na superfície externa da raiz H&E (32x). **Fig. 3C** (grupo hidróxido de cálcio/coágulo – HC/Co) - inúmeras células inflamatórias (CI) são observadas próximas ao espaço do esmalte (E) que se apresenta irregular. O epitélio estratificado gengival (EG) apresenta-se espessado e projeta-se para as faces mesial e distal da superfície externa da raiz. Subjacente ao epitélio gengival (EG), o ligamento periodontal (LP) é observado. Nas faces distal e palatina, trabéculas ósseas (TO) projetam-se a partir do processo alveolar (PA) em direção à superfície externa da raiz. CR, canal radicular; D, dentina. H&E (37,5x). **Fig. 3D** - (grupo hidróxido de cálcio/coágulo/laser – HC/Co/L) - O espaço periodontal (EP) nas faces mesial e palatina da raiz apresenta áreas com inúmeras células inflamatórias (CI). O espaço do esmalte (E) perdeu sua delimitação; na face distal da raiz dentária observa-se amplo espaço entre a superfície externa da raiz e o processo alveolar (PA). O processo alveolar (PA) circundando a raiz apresenta diversas lacunas ósseas, aparentemente vazias, ou seja, sem osteócitos. CR, canal radicular; D, dentina. H&E (37,5x). **Fig. 3E** - detalhe da fig. 3B mostrando lacuna de reabsorção radicular (LR) externa com extenso infiltrado inflamatório (CI) . H&E (138x). **Fig. 3F** - detalhe da figura 3C mostrando as trabéculas ósseas (TO) irregulares estendendo-se do processo alveolar (PA) em continuidade com a superfície externa da raiz, com presença de pontos de anquilose (A). Osteoblastos (OB) na superfície óssea e osteócitos (setas) são observados. D, dentina. H&E (37,5x). **Fig. 3G** - detalhe de uma porção da face mesial da figura 3D. Note intenso infiltrado inflamatório (CI) observado no espaço periodontal (EP). A trabécula óssea (TO) apresenta-se delgada e irregular. Note a ausência de osteócitos nas lacunas ósseas. D, dentina. H&E (37,5x).



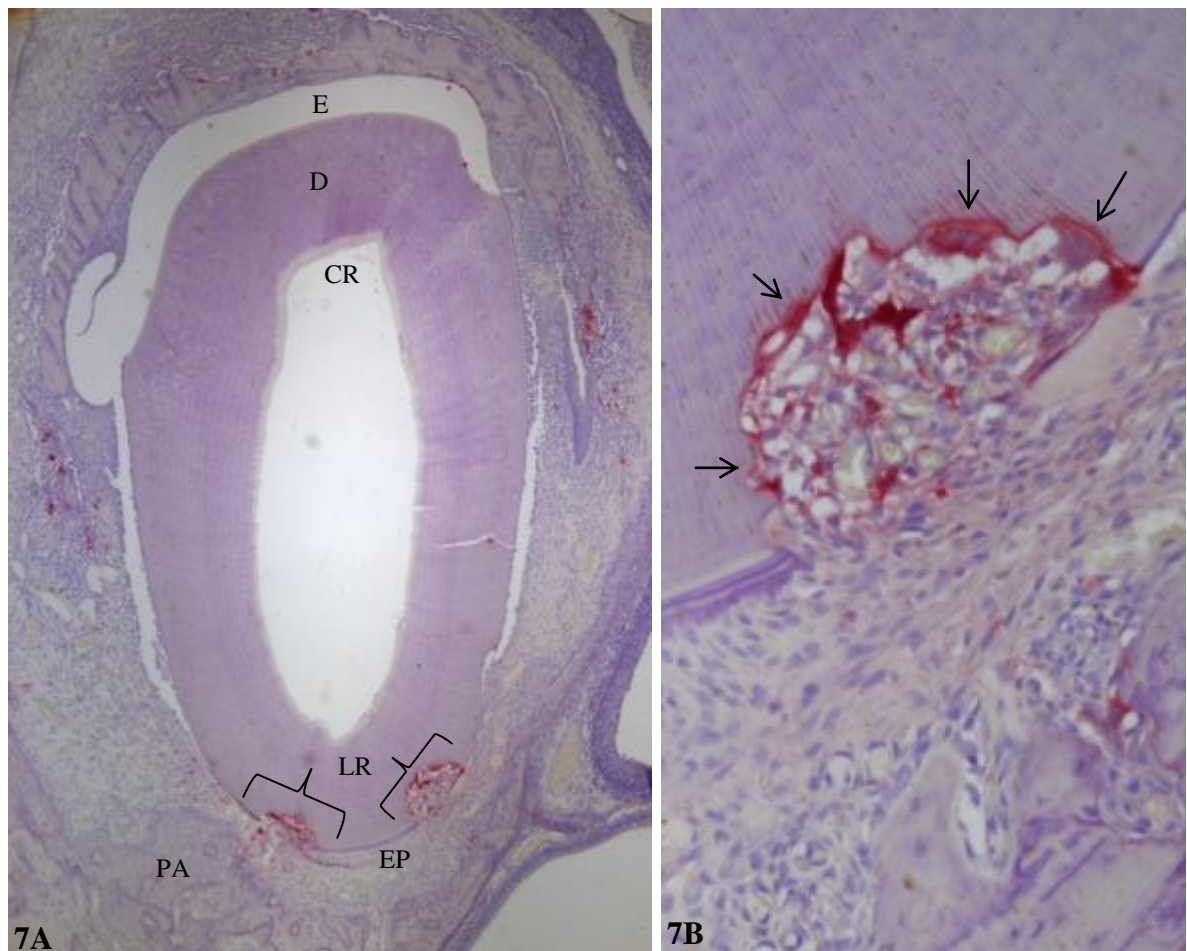
Figuras 4A-4D – Fotomicrografias mostrando cortes transversais da porção média de raízes de incisivos superiores direitos de ratos. **Fig. 4A** (grupo hidróxido de cálcio/PRP - HC/PRP) – O ligamento periodontal (LP) está presente nas faces distal, palatina e mesial da raiz. O processo alveolar (PA) apresenta-se delgado na mesial (*) e trabéculas ósseas (TO) irregulares estão localizadas na região distal e palatina. O espaço do esmalte (E) apresenta-se irregular; na mesial, diversas células inflamatórias (CI) são observadas próximas ao espaço do esmalte (E) além de área de reabsorção superficial. CR, canal radicular; D, dentina. H&E (37,5x). **Fig. 4B** (grupo hidróxido de cálcio/PRP – HC/PRP) – O ligamento periodontal (LP) está presente na porção palatina da superfície radicular, estendendo-se até a porção média da face mesial. Numerosas células inflamatórias (CI) são observadas no espaço periodontal. O espaço do esmalte (E) perdeu a sua delimitação e está contínuo ao espaço periodontal na face distal da raiz, estendendo-se até a face palatina (seta). O processo alveolar (PA) apresenta-se contínuo, porém delgado na face distal. Na face mesial, as pequenas trabéculas ósseas apresentam-se descontínuas (*). CR, canal radicular; D, dentina; E, espaço do esmalte; LP, ligamento periodontal; PA, processo alveolar. H&E (37,5x). **Fig 4C** (grupo hidróxido de cálcio/PRP/LBI – HC/PRP/L) – O espaço periodontal (EP) é ocupado em sua maior extensão por ligamento periodontal. Na distal, note a presença de estruturas de aspecto semelhante ao cimento celular que se projetam a partir da superfície externa da raiz em direção ao processo alveolar (PA) (setas). Na mesial, as trabéculas ósseas (TO) são irregulares e há presença de áreas de anquilose (*). Células inflamatórias (CI) são observadas na região vestibular, próximas ao espaço ocupado pelo esmalte (E). CR, canal radicular; D, dentina. H&E (37,5x). **Fig. 4D** (grupo hidróxido de cálcio/PRP/LBI – HC/PRP/L) – O espaço periodontal (EP) está ocupado em sua maior extensão por tecido conjuntivo. O epitélio reduzido do esmalte está aquém da junção cimento-esmalte (JCE). Na face palatina, duas áreas escavadas (LR) são observadas na superfície externa da raiz. CR, canal radicular; D, dentina; E, espaço do esmalte; PA, processo alveolar. H&E (37,5x).



Figuras 5A-5E – Fotomicrografias mostrando cortes transversais da porção média de raízes de incisivos superiores direitos de ratos. **Fig. 5A** (grupo PRP/coágulo – PRP/Co) – O ligamento periodontal (LP) está presente nas faces distal, palatina e mesial da raiz. Trábeculas ósseas (TO) delgadas e diversas células inflamatórias (CI) são observadas na região mesial. Presença de reabsorção radicular superficial na distal (*). E, espaço do esmalte; D, dentina; CR, canal radicular. H&E (45x). **Fig. 5B** (grupo PRP/coágulo – PRP/Co) – O ligamento periodontal (LP) está presente nas faces distal, palatina e mesial da raiz. Note a presença de remanescentes do PRP dentro do canal radicular (CR). E, espaço do esmalte; D, dentina; PA, processo alveolar; TO, trabéculas ósseas. H&E (42x). **Fig. 5C** – Detalhe da Fig. 5A mostrando áreas de reabsorção superficial do cimento e da dentina com cimento neoformado (setas). D, dentina; LP, ligamento periodontal. H&E (172x). **Fig. 5D** - Detalhe da Fig. 5B mostrando disposição oblíqua das fibras do ligamento periodontal (LP) em relação à superfície radicular. D, dentina; PA, processo alveolar. H&E (172x). **Fig. 5E** (grupo PRP/coágulo/LBI – PRP/Co/L) – O espaço periodontal (EP) é ocupado em sua maior extensão por ligamento periodontal. Dentina (D) e cimento recobrendo a superfície radicular estão íntegros. Note a presença de remanescentes do PRP dentro do canal radicular (CR), Trabéculas ósseas (TO) irregulares são vistas na mesial. PA, processo alveolar. H&E (45x).



Figuras 6A-6D – Fotomicrografias mostrando cortes transversais da porção média de raízes de incisivos superiores direitos de ratos. **Fig. 6A** (grupo PRP/PRP) - O ligamento periodontal (LP) está presente nas faces distal, palatina e mesial da raiz. Presença de lacuna de reabsorção (LR) na superfície radicular mesial. Note, no canal radicular, a presença de remanescente do PRP e células inflamatórias (CI). E, espaço do esmalte; D, dentina; PA, processo alveolar; VS, vasos sanguíneos. H&E (40x). **Fig. 6B** – Detalhe da região distal da Fig. 6A mostrando disposição oblíqua das fibras do ligamento periodontal (LP) em relação à superfície radicular, com presença de inúmeros vasos sanguíneos. D, dentina. H&E (415x). **Fig. 6C** (grupo PRP/ PRP/Laser – PRP/PRP/L) – O espaço periodontal (EP) está ocupado em sua maior extensão por ligamento periodontal. Presença de células inflamatórias (CI) na distal e de lacunas de reabsorção (LR) na mesial. Note a presença de inúmeros vasos sanguíneos na mesial. E, espaço do esmalte; D, dentina; CR, canal radicular; PA, processo alveolar; TO, trabéculas ósseas. H&E (40x). **Fig. 6D** – O espaço periodontal encontra-se com inúmeras células inflamatórias (CI). Na mesial, trabéculas ósseas estão afiladas (TO). Há remanescentes de PRP intracanal. D, dentina; PA, processo alveolar. H&E (42x).



Figuras 7A-7B – Fotomicrografias mostrando cortes transversais da porção média de raízes de incisivos superiores direitos de ratos. **Fig. 7A** - imagem representativa de todos os grupos experimentais mostrando a marcação das células TRAP-positivas justapostas às lacunas de reabsorção radicular (áreas demarcadas) . TRAP (52x). **Fig. 7B** – detalhe da Fig. 7A mostrando as células TRAP-positivas (setas). TRAP (345x).

DISCUSSÃO

O objetivo desse estudo foi avaliar, por meio de análise histológica e histoquímica, os efeitos da irradiação com LBI, da aplicação do PRP e da associação de ambos no reimplante tardio de incisivos superiores de ratos.

O modelo experimental utilizado foi definido de acordo com a acessibilidade aos animais, ao uso constante desse métodos em pesquisas e pela metodologia já estabelecida na literatura para simular a avulsão e reimplante de incisivos superiores de ratos (2,9,18,20,21).

No presente estudo, os dentes foram mantidos em leite bovino desnatado por 40 minutos em temperatura ambiente, tempo selecionado para simulação de um reimplante tardio (2). O armazenamento de dentes avulsionados em leite é indicado pela *International Association of Dental Traumatology – IADT* (Andersson et al., 2012). A literatura relata que até 45 minutos, o leite é eficaz em manter as células do ligamento periodontal viáveis (22), sendo o leite desnatado mais apropriado devido ao menor teor de gordura (23). O leite em temperatura ambiente é mais comumente encontrado próximo ao local do acidente, e seu uso reproduz uma situação mais próxima da realidade (6-8).

No presente estudo, a administração de antibiótico foi utilizada para controlar a contaminação bacteriana da superfície do dente exposta e para evitar interferências na reabsorção radicular (1,18). Os processos inflamatórios e de reparo em ratos ocorrem entre 2 e 4 semanas após o reimplante, por isso os animais foram sacrificados 30 dias após o reimplante (24).

A ocorrência de reabsorção inflamatória ou reabsorção por substituição e anquilose está diretamente relacionada a uma série de fatores, como a integridade da camada de cimento, viabilidade de células do ligamento periodontal, condições do tecido pulpar e intensidade do trauma (4).

A regeneração do ligamento periodontal é o resultado mais desejável após o reimplante dentário (10), entretanto os protocolos de tratamento propostos atualmente têm o objetivo de evitar ou minimizar o processo inflamatório, a reabsorção radicular externa, foco do presente estudo, e a consequente perda do dente (2).

No presente, a laserterapia foi empregada com o intuito de modular o processo inflamatório que ocorre após o reimplante dentário, já que a inflamação contribui para um ambiente que promova a presença de células clásticas e consequente reabsorção dos tecidos mineralizados (2).

O protocolo de irradiação empregado no presente estudo usou o LBI infravermelho GaAlAs com comprimento de onda de 808 nm, baseando-se nos relatos de que a irradiação da superfície radicular com LBI infravermelho, independente do comprimento de onda, tem melhorado o reparo do ligamento periodontal de dentes de ratos reimplantados (2,25) e devido ao seu maior potencial de penetração nos tecidos em relação ao laser vermelho (26).

No presente estudo, não ficou evidente nenhuma diferença nos índices de reabsorção radicular entre os grupos irradiados ou não irradiados com laser, independentemente dos tratamentos intracanal ou alveolar, ou seja, o uso do LBI não demonstrou influencia no reparo pós reimplante. Estes achados diferem de estudos que mostraram que o LBI aplicado em dentes reimplantados favoreceu o reparo periodontal e reduziu a reabsorção radicular quando comparado aos dentes que não foram irradiados, demonstrando que o efeito anti-inflamatório do LBI pode ter ajudado a reduzir o processo de reabsorção (9,25). Apesar de diferenças nos parâmetros da laserterapia, nossos resultados foram semelhantes aos observados por Saito et al., (18), onde não foi observada melhora no reparo periodontal após aplicação do LBI infravermelho no alvéolo dentário e LBI vermelho na superfície radicular. No entanto, também concordamos com os autores ao indicarem a necessidade de demais pesquisas

abrangendo variáveis dos parâmetros da laserterapia, as quais podem alterar a resposta dos tecidos biológicos à irradiação laser (18).

Outro método que tem sido utilizado em reimplante dentário é a aplicação do PRP (10). O PRP é uma concentração autóloga de plaquetas em um pequeno volume de plasma (11). Ele é capaz de estimular a proliferação, migração, adesão celular e síntese de fatores de crescimento, melhorando e acelerando a cicatrização de lesões em tecidos moles e mineralizados (13,27), apresentando efeito positivo na regeneração do periodonto (12).

Os resultados do presente estudo mostraram que, em todos os grupos onde se realizou a aplicação de PRP dentro do alvéolo dentário previamente ao reimplante, este ofereceu sempre menores porcentagens de reabsorção radicular em comparação ao reimplante tardio seguindo o tratamento convencional, ou seja, hidróxido de cálcio intracanal e coágulo no alvéolo (grupo HC/Co), com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Seguindo o mesmo princípio, Assunção et al. (10) mostraram que os casos que receberam aplicação de PRP dentro do alvéolo dentário previamente ao reimplante apresentaram menor porcentagem de reabsorção radicular inflamatória quando comparado ao reimplante na ausência de PRP.

Os índices de reabsorção dentária no grupos onde o PRP foi inserido no alvéolo dentário e no canal radicular (grupo PRP/PRP), foram semelhantes aos encontrados no grupo HC/PRP ($p > 0,05$), mostrando que o PRP pode ser uma alternativa viável, como um substituto ao hidróxido de cálcio no interior do canal radicular em casos de reimplantes tardios.

Além da avaliação do efeito do LBI e do PRP empregados individualmente, avaliamos também a associação desses dois tratamentos em reimplante dentário tardio com o intuito de aumentar o potencial reparador do PRP. É importante salientar que, apesar de não haver diferenças significantes entre os resultados dos grupos irradiados ou não, a associação do PRP, inserido no alvéolo e/ou no canal radicular, com a aplicação do laser, sempre

ofereceu menores índices de reabsorção radicular, com exceção dos grupos HC/PRP e PRP/PRP, que igualmente apresentaram-se significativamente melhor que o tratamento convencional (HC/CO). Apesar de não alcançar significância estatística sobre grande parte dos grupos estudados, o grande destaque com os menores índices de reabsorção radicular, esteve por conta do grupo que recebeu o PRP dentro do alvéolo, o PRP intracanal e a irradiação laser. Esses achados sugerem outras pesquisas avaliando esta associação como possível premissa para um futuro protocolo de tratamento clínico para casos de reimplantes tardios.

Além do uso de métodos histológicos e histomorfométricos para avaliação da reabsorção radicular após reimplante dentário, a avaliação histoquímica da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) também tem sido empregada (18). A TRAP é uma isoenzima de fosfatase ácida encontrada principalmente no tecido ósseo, atua com marcador da enzima que demonstra atividade clástica e desempenha um papel importante nos processos de reabsorção (28). No presente estudo, a quantidade de células clásticas/mm de superfície radicular reabsorvida foi semelhante em todos os grupos, não tendo influência de qualquer tratamento. Por outro lado, Carvalho et al. (2) observaram um aumento significativo de células TRAP-positivas em todos períodos avaliados no grupo onde a irradiação com LBI foi realizada no momento e durante 15 dias após o reimplante dentário. Essa aplicação por 15 dias consecutivos após o reimplante pode ter levado a diferenciação e ativação de clastos pelo LBI, resultando em reabsorção radicular inflamatória externa intensa.

CONCLUSÃO

As condições inerentes ao desenvolvimento do presente estudo, nos permitem concluir que, quando o coágulo foi deixado no alvéolo, nenhum dos tratamentos ofereceu melhora significativa nos índices de reabsorção radicular, exceto o grupo que recebeu o PRP intracanal associado à irradiação laser, cuja reabsorção foi significativamente menor que o grupo que recebeu somente o hidróxido de cálcio intracanal. A inserção do PRP no alvéolo, independentemente da associação ao laser ou do tratamento intracanal, sempre ofereceu índices de reabsorção menores que o grupo com coágulo no alvéolo e hidróxido de cálcio intracanal. Os diferentes tratamentos não foram capazes de impedir a reabsorção radicular, bem como nenhum tratamento foi capaz de reduzir significativamente o número de clastos na superfície radicular.

REFERÊNCIAS

- 1 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;28:88–96.
- 2 Carvalho FB, Andrade AS, Barbosa AFS, Aguiar MC, Cangussu MCT, Pinheiro ALB et al. Evaluation of laser phototherapy (λ 780 nm) after dental replantation in rats. *Dent Traumatol* 2016;32:488-94.
- 3 Patel S, Ford T P. Is the resorption external or internal? *Dent Update* 2007;34:218-29.
- 4 Andreassen JO, Andressen FM. Avulsões. In: Andreasen JO, Andreasen FM, Andersson L. eds. *Texto e atlas colorido de traumatismo dental*. 3ª edição, Porto Alegre: Artmed Editora; 2001, 778 p.
- 5 Carvalho ER, Costa FTS, Campos MS, Anbinder AL, Neves ACC, Habitante SM, et al. Root surface treatment using diode laser in delayed tooth replantation: radiographic and histomorphometric analyses in rats. *Dent Traumatol* 2012;28:429-36.
- 6 Santos CLV, Sonoda CK, Poi WR, Panzarini SR, Sundefeld MLMM, Negri MR. Delayed replantation of rat teeth after use of reconstituted powdered milk as a storage medium. *Dental Traumatol* 2009;25:51-7
- 7 Ricieri CB, Sonoda CK, Aranega AM, Panzarini SR, Poi WR, Sundefeld MLMM et al. Healing process of incisor teeth of diabetic rats replanted after storage in milk. *Dent Traumatol* 2009;25:284-9.
- 8 Reis MVP, Moura CCG, Soares PBF, 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;40:665-9.

- 9 Vilela RG, Gjerde K, Frigo L, Leal-Junior ECP, Lopes-Martins RAB, 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* 2011;27:551-7.
- 10 Assunção LRS, Colenci R, do Amaral CCF, Sonoda CK, Bomfim SRM, Okamoto R et al. Periodontal tissue engineering after tooth replantation. *J Periodontol* 2011;82:758-66.
- 11 Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:489-96.
- 12 Anitua E, Troya M, Orive G. An autologous platelet-rich plasma stimulates periodontal ligament regeneration. *J Periodontol* 2013;84:1556-66.
- 13 Mendonça JP. Estudo histológico da ação do plasma rico em plaquetas, associado ou não ao laser de baixa potência, a cicatrização por primeira intenção, em ratos Wistar.[Dissertação] Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2009.
- 14 Gresner P, Watala C, Sikurova L. The effect of green laser light irradiation on whole blood platelets. *J Photochem & Photobiol B* 2005;79:43–50.
- 15 Saygun I, Nizam N, Ural AU, Serdar MA, Avcu F, Tözüm TF. Low-level laser irradiation affects the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin-like growth factor-I (IGF-I), and receptor of IGF-I (IGFBP3) from osteoblasts. *Photomed Laser Surg* 2012;30:149-54.
- 16 Nagata MJ, de Campos N, Messoria MR, Pola NM, Santinoni CS, Bomfim SR et al. Platelet-rich plasma, low-level laser therapy, or their combination promotes periodontal regeneration in fenestration defects: a preliminary in vivo study. *J Periodontol* 2014;85:770-8

- 17 Manfrin TM, Poi WR, Okamoto R, Panzarini SR, Sonoda CK, Saito CT, Hamanaka EF, Martins CM. Expression of OPG, RANK, and RANKL proteins in tooth repair processes after immediate and delayed tooth. *J Craniofac Surg* 2013;24:e74-80.
- 18 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;27:30-9.
- 19 Trevisan CL, Panzarini SR, Brandini DA, Poi WR, Luvizuto ER, Dos Santos CL, Saito CT. Calcium hydroxide mixed with camphoric p-monochlorophenol or chlorhexidine in delayed tooth replantation. *J Craniofac Surg* 2011;22:2097-101.
- 20 Furfaro F, Ang ES, Lareu RR, Murray K, Goonewardene M. A histological and micro-CT investigation in to the effect of NGF and EGF on the periodontal, alveolar bone, root and pulpal healing of replanted molars in a rat model – a pilot study. *Prog Orthod* 2014;6:15-2.
- 21 Marão HF, Mao JJ, Casatti CA, Coelho Pg, Ervolino E, Zhou J et al. Effects of ovariectomy on periodontal tissues following tooth replantation. *Archives of Oral Biology* 2016;65:9-16.
- 22 Blomlof L, Otteskog P, Hammarstrom L. Effect of storage in media with different ion strengths and osmolalities on human periodontal ligament cells. *Scand J Dent Res* 1981;89:180–7.
- 23 Harkacz OM, Carnes DL, Walker WA. Determination of periodontal ligament cell viability in the oral rehydration fluid gatorade and milks of varying fat content. *J Endod* 1997;23:687-90.
- 24 Panzarini SR, Okamoto R, Poi WR, Sonoda CK, Pedrini D, Da Silva PE et al. Histological and immunohistochemical analyses of the chronology of healing process after immediate tooth replantation in incisor rat teeth. *Dent Traumatol* 2013;29:15-22.

- 25 Matos FS, Godolphim FJ, Correia AMO, Albuquerque-Junior RLC, Paranhos LR, Rode SM et al. Effect of laser photobiomodulation on the periodontal repair process of replanted teeth. *Dental Traumatol* 2016;32:402–8.
- 26 Karu T. Laser biostimulation: a photobiological phenomenon. *J Photochem & Photobiol B* 1989;3:638-40.
- 27 Law AS. Considerations for regeneration procedures. *J Endod* 2013;39(3S):S44-56.
- 28 Halleen JM, Tiitinen SL, Ylipahkala H, Fagerlund KM, Vaäananen HK. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption. *Clin Lab* 2006;52:499-509.

4 PUBLICAÇÃO 2

Efeito da laserterapia, plasma rico em plaquetas e sua associação em reimplante dentário: análise microtomográfica*.

RESUMO: O uso do plasma rico em plaquetas (PRP) ou do laser de baixa intensidade (LBI) tem sido estudado para melhorar o prognóstico de dentes reimplantados tardiamente. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da laserterapia, da aplicação do PRP e da associação de ambos sobre incisivos de ratos reimplantados tardiamente por meio de análise em microtomografia (micro-CT). Cinquenta ratos Holtzman adultos foram divididos em dez grupos experimentais (n=5): grupo controle onde o incisivo superior direito não recebeu alguma intervenção, e nove grupos onde houve a extração dentária simulando uma avulsão seguida do reimplante. Após exodontia, os incisivos superiores direitos foram mantidos no leite por 40 minutos. Em um grupo, a polpa foi mantida no canal radicular, e nos demais a polpa foi removida e o canal radicular foi preenchido com hidróxido de cálcio (HC) ou PRP. Em seguida, foi realizada ou não irradiação com LBI no dente e no alvéolo, e o dente foi reimplantado. A comparação da porcentagem de reabsorção radicular foi realizada por ANOVA e Tukey ($\alpha = 0,05$). Os resultados mostraram que o PRP ou LBI empregados isoladamente não ofereceram melhora significativa nos índices de reabsorção radicular de dentes de rato reimplantados tardiamente ($p < 0,05$). Os grupos que foram tratados com a associação do PRP no alvéolo e com a irradiação com LBI, independentemente do material usado para preencher o canal radicular, apresentaram menos reabsorção radicular em relação ao tratamento convencional com hidróxido de cálcio intracanal e coágulo no alvéolo ($p < 0,05$). Pode-se concluir que a associação PRP e LBI pode se constituir em um protocolo promissor de tratamento de dentes reimplantados tardiamente.

Palavras-Chave: Reimplante dentário. Plasma rico em plaquetas. Terapia com luz de baixa intensidade.

*Artigo submetido e escrito segundo as normas do periódico *Dental Traumatology*

INTRODUÇÃO

O melhor tratamento para dentes permanentes avulsionados após um traumatismo é seu reimplante imediato (1-3). Porém, em muitos casos o dente permanece por longo tempo fora do alvéolo e em condições de armazenamento impróprias, o que prejudica o prognóstico (1-3). Pesquisas sobre meios de armazenamento e protocolos de tratamento de dentes reimplantados tardiamente têm sido realizadas na tentativa de evitar a perda posterior do dente (2, 4).

Um método empregado em engenharia tecidual, que visa à regeneração do periodonto, inclusive em casos de reimplantes dentários, é o uso do plasma rico em plaquetas - PRP (4-6). O PRP é uma concentração autóloga de plaquetas em um pequeno volume de plasma (7-9). O PRP ativado libera fatores de crescimento que estimulam a proliferação, migração e diferenciação celular por meio da regulação de uma variedade de processos celulares (9). O uso do PRP leva à cicatrização do tecido conjuntivo, regeneração e reparação óssea (4). Estudo mostrou que dentes de cães avulsionados, preenchidos com hidróxido de cálcio e reimplantados com PRP inserido dentro do alvéolo apresentaram menor porcentagem de reabsorção radicular inflamatória quando comparados ao grupo no qual não foi usado PRP. Na presença de PRP, também não foram observadas regiões de anquilose (4).

Outra tecnologia que vem sendo estudada em casos de avulsão e reimplante dentário experimental é a terapia com laser de baixa intensidade - LBI (10-13). Após a ocorrência de trauma, ocorre uma resposta inflamatória a partir dos tecidos de suporte dentário agredidos, e o uso do LBI, devido sua propriedade de modular o processo inflamatório, acelera o processo de reparo, reduzindo a reabsorção radicular externa inflamatória (11-13). Além disso, o LBI apresentou efeitos positivos na proliferação de fibroblastos (14) e na adesão dessas células à superfície radicular (15), o que pode melhorar o prognóstico de dentes avulsionados e reimplantados.

O LBI pode desempenhar um papel importante na regeneração do periodonto pelo aumento da produção de fatores de crescimento, como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de transformação do crescimento (TGF- β), que são importantes para o ligamento periodontal. A irradiação com LBI também induz a degranulação plaquetária e a liberação de fatores de crescimento. Portanto, é possível que a associação do PRP ao LBI possa aumentar a concentração de fatores de crescimento no local da injúria e acelerar a cicatrização (5) em dentes reimplantados tardiamente.

A avaliação das reabsorções dentárias por microtomografia computadorizada (micro-CT) vem ganhando destaque dentre os estudos, e pode auxiliar na compreensão dos eventos biológicos que ocorrem após o reimplante dentário (16,17). A micro-CT é uma técnica que apresenta alta resolução de imagem (18) e permite a análise bi e tridimensional dos espécimes em múltiplos planos (19). Além disso, a realização do escaneamento pode ser realizada com o animal vivo, o que permite comparar os dados de diferentes tempos de avaliação em um mesmo animal, aumentando a precisão do estudo.

O objetivo desse estudo foi avaliar, por meio de análise por micro-CT in vivo, os efeitos da laserterapia, da aplicação do PRP e associação de ambos sobre o reimplante tardio de incisivos superiores de ratos submetidos a diferentes protocolos de tratamento.

MATERIAL E MÉTODO

Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com as diretrizes éticas e regulamentação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara-FOAr que aprovou o projeto (Processo CEUA nº 46/2014 – ANEXO A). Foram utilizados 50 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Holtzman) pesando entre 250g e 280g. Durante todo o período experimental os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno, em temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ($55\pm 10\%$)

controladas e fotoperíodo de 12 horas, e receberam água *ad libitum*, alimentação macia e ração granulada triturada durante 07 dias após os procedimentos cirúrgicos, a partir do 8º dia, os animais receberam ração sólida.

Coleta de sangue para obtenção do PRP

Os animais foram anestesiados por meio de injeção intramuscular de cloridrato de xilazina 2% (0,04 mL/100g de peso corporal; Anasedan, Agribands do Brasil Ltda, Paulínia, SP, Brasil) associado ao cloridrato de ketamina 10% (0,08 mL/100g de peso corporal; Dopalen, Agribands do Brasil Ltda, Paulínia, SP, Brasil). Em seguida, os animais foram submetidos à canulação da veia jugular para a coleta de 4 mL de sangue em um tubo plástico (Axygen Scientific, Union city, CA, USA) contendo 0,22 mL de citrato de sódio a 3,2% para prevenir a coagulação (APÊNDICE A – Fig. A.1). As amostras de sangue permaneceram em temperatura ambiente até a realização da exodontia do incisivo superior direito e foi processada durante a permanência do dente no meio de armazenamento (leite).

Procedimento cirúrgico

Imediatamente após a coleta de sangue, foi realizada antissepsia da região anterior da maxila com digluconato de clorexidina a 2% e o incisivo superior direito foi cuidadosamente extraído para simular a avulsão dentária (APÊNDICE A – Fig. A.2). Após a extração, os incisivos permaneceram em 5 mL de leite desnatado (Parmalat Brasil S/A Indústria de alimentos; Jundiaí, SP, Brasil) em temperatura ambiente por 40 minutos, para simular o reimplante dentário tardio. Os dentes foram então lavados com solução salina estéril e a papila dentária e o órgão do esmalte foram removidos com uma lâmina de bisturi número 15. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em um grupo controle e nove grupos (n=5), de acordo com o protocolo de tratamento que o dente e o alvéolo receberam antes do reimplante. Dentre esses, em um grupo, a polpa foi mantida no interior do canal radicular e o dente foi reimplantado em seguida. Nos demais, a polpa foi removida por via retrógrada com uma lima

tipo Hedstroen nº35 (Dentsply Maileffer, Ballaigues, Suíça), e o canal radicular foi irrigado com solução salina estéril, seco com pontas de papel absorvente e preenchido com hidróxido de cálcio (Ultracal XS, Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) ou PRP. No alvéolo dentário, após irrigação com solução salina estéril, foi aplicado o PRP ou foi mantido o coágulo. Em seguida, foi realizada ou não irradiação com LBI e o dente foi reimplantado. No grupo controle não foi realizada qualquer intervenção. Os grupos experimentais estão mostrados na tabela 1.

Tabela 1: Grupos experimentais de acordo com o tratamento realizado.

Grupos experimentais	Preenchimento do canal radicular	Tratamento do Periodonto/ Alvéolo	Irradiação com LBI
<i>Po/Co</i>	Polpa	Coágulo	-
<i>HC/Co</i>	Hidróxido de cálcio	Coágulo	-
<i>HC/Co/L</i>			+
<i>HC/PRP</i>		PRP	-
<i>HC/PRP/L</i>			+
<i>PRP/Co</i>	PRP	Coágulo	-
<i>PRP/Co/L</i>			+
<i>PRP/PRP</i>		PRP	-
<i>PRP/PRP/L</i>			+
<i>Controle</i>	Não foi realizada intervenção		

Po, polpa; Co, coágulo; HC, hidróxido de cálcio; PRP, plasma rico em plaquetas; L, laser de baixa intensidade; +, irradiação com LBI; -, ausência de irradiação com LBI.

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais receberam, por via intramuscular, uma dose única de 24.000 UI de Pentabiótico (Benzilpenicilina benzatina-12.000 UI, Benzilpenicilina procaína- 6.000 UI, Benzilpenicilina potássica- 6.000 UI, Sulfato de Diidroestreptomicina- 5 mg, Sulfato de Estreptomicina- 5 mg) (Fort Dodge Saúde Animal

Ltda., Campinas, SP, Brasil), e por via oral, 0,03mg de dipirona sódica por 100g de peso nos três primeiros dias.

Preparo do PRP e contagem das plaquetas

Para a obtenção do PRP, 2 mL de sangue foram centrifugados por 7 minutos a 1200 rpm, a 22°C. Para a aplicação no alvéolo e no canal radicular, 500 µL de PRP foram ativados com 25 µL de cloreto de cálcio a 10% (APÊNDICE A – Fig. A.3). Em seguida, o canal radicular foi preenchido por via retrógrada com PRP ativado e 25 µL foram inseridos no alvéolo dentário empregando uma ponta flexível de 200µl acoplada a uma pipeta. A contagem das plaquetas foi realizada em câmara de Neubauer a partir de 10 µL de PRP diluídos em 1990 µL de oxalato de amônio a 1%. A média da contagem de plaquetas no PRP foi de $141,4 \pm 56,73 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$.

Protocolo de irradiação com LBI

Foi utilizado o laser de baixa intensidade infravermelho Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs) com comprimento de onda de 808nm – TF Premier Plus (MM Optics, São Carlos, SP, Brasil). Foram realizadas três irradiações de modo contínuo e pontual, com potência de 10 mW. Primeiramente, após o preenchimento do canal radicular com HC ou com PRP, o LBI foi aplicado nos terços médio e apical da raiz por 7,2 segundos e densidade de energia de $2,4 \text{ J/cm}^2$ em cada ponto, totalizando $4,8 \text{ J/cm}^2$ na superfície radicular. Em seguida, foi feita aplicação na embocadura do alvéolo por 14,4 segundos e densidade de energia de $4,8 \text{ J/cm}^2$ e os dentes foram submetidos ao reimplante. Após a realização dos protocolos de tratamento e imediatamente após o reimplante, os animais ainda anestesiados foram submetidos ao escaneamento microtomográfico.

Análise por micro-CT

As cabeças dos animais foram escaneadas in a SkyScan 1176 unit (SkyScan 1176 in vivo, Bruker-micro CT, Kontich, Bélgica). Foram realizados dois escaneamentos in vivo: inicial, imediatamente após a realização do reimplante dentário; e final, após 30 dias do inicial. Os parâmetros para o escaneamento foram baseados em estudos anteriores (2, 17), sendo utilizados fonte de tensão de 80kV e fonte de corrente de 300 μ A, filtro de cobre e alumínio com 0,5 mm de espessura, voxel isotrópico de 18 μ m e ciclo de evolução de 360°. A reconstrução das imagens da maxila foi realizada com software NRecon (V1.6.4,7; SkyScan, Bélgica) utilizando a ferramenta “fine turning” que permite avaliar cada valor dos parâmetros de reconstrução possibilitando a seleção da imagem com menor quantidade de ruídos e artefatos. As ferramentas “*Ring artifacts reduction*”, “*Beam-hardening correction*”, “*Smoothing*” e “*CS Rotation*” foram padronizadas nos valores 10, 40%, 6 e 360°, respectivamente. Foi utilizado o software Data Viewer (V1.5.2.4; SkyScan, Bélgica) para a orientação das imagens nos planos axial, sagital e transaxial e as imagens foram salvas no plano transaxial. Em seguida, as imagens de cada animal, inicial e 30 dias após o reimplante, foram orientadas (APÊNDICE B – Fig. B.1) e sobrepostas utilizando o software Data Viewer (V1.5.2.4; SkyScan, Bélgica) afim de alinhá-las geometricamente, obtendo-se assim o correlograma dessas imagens (APÊNDICE B – Fig. B.2). As imagens registradas foram analisadas empregando o software CTAn (v1.11.8; SkyScan, Bélgica). Para todos os espécimes, o intervalo de avaliação foi definido em 2414 μ m, correspondendo a 70 secções de 0,035mm que abrangeram o terço médio da raiz. Em seguida, para cada imagem inicial foi criada a região de interesse (ROI) (APÊNDICE B – Fig. B.3) em todas as secções transversais, sendo que, para facilitar a visualização e limite da raiz foram utilizadas as ferramentas “*Palette - Original*” e “*Palette - Black Body*”. Os valores do histograma de densidade (escala de cinza) para o reconhecimento das regiões mineralizadas, processo denominado binarização

foram de 78 a 115 (limite inferior) e 230 a 255 (limite superior). A ROI (Figura 1) e os valores da imagem binária criados para cada imagem inicial foram utilizados para a análise do mesmo espécime no período de 30 dias (APÊNDICE B – Fig. B.4). Foi utilizado o valor de “Bone Volume” (BV), que representa o valor do volume de tecido mineralizado da raiz em mm^3 . A diferença entre os volumes inicial e 30 dias após o reimplante representa a quantidade de reabsorção radicular que foi expressa em percentual. Todas as medidas foram realizadas por um avaliador previamente calibrado em dois momentos distintos em um intervalo de 2 semanas (20).

Os dados obtidos foram analisados por meio dos programas estatísticos Graph Pad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA.) e SPSS versão 20. ANOVA and Tukey test were used para comparar a reabsorção radicular entre os grupos. O coeficiente de correlação intra-classe (ICC) foi usado para avaliar a reprodutibilidade intraexaminador. Foi adotado o nível de significância de 5%.

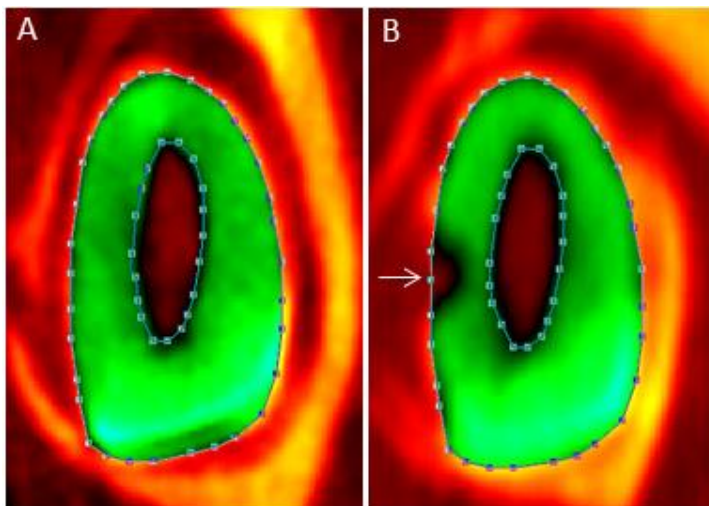


Figura 1 - Delimitação da região de interesse (ROI) dos espécimes imediatamente após o reimplante (A) e 30 dias após (B), utilizando a ferramenta “Palette - Black Body”. Seta indica região de reabsorção radicular. Fonte: Autoria própria.

Resultados

O ICC intraexaminador foi de 0,96. A comparação da porcentagem de reabsorção radicular obtida por meio da diferença de volume entre os períodos inicial (imediatamente após o reimplante) e final (30 dias após o inicial) está mostrada na figura 2. Houve reabsorção radicular em todos os grupos. Os grupos HC/PRP/L e PRP/PRP/L apresentaram menores porcentagens de reabsorção radicular, porém sem diferença estatisticamente significativa dos grupos HC/PRP, PRP/C e PRP/PRP ($p > 0,05$). Por outro lado, o volume de reabsorção radicular nos grupos HC/PRP/L e PRP/PRP/L foi significativamente menor do que nos grupos Po/Co, HC/Co, HC/Co/L e PRP/Co/L ($p < 0,05$). Na análise qualitativa do grupo controle, no qual os animais não foram submetidos a qualquer intervenção, não foram observadas regiões de reabsorção radicular.

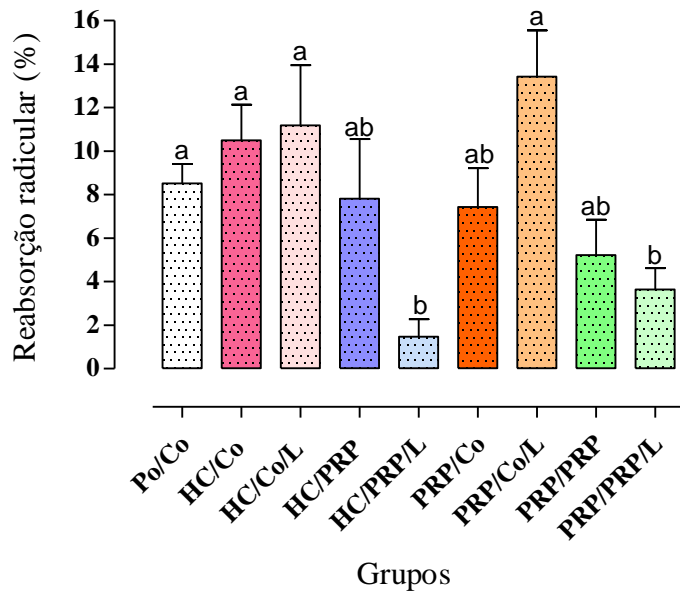


Figura 2. Média e desvio-padrão da média de porcentagem de reabsorção radicular. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Po, polpa; Co, coágulo; HC, hidróxido de cálcio; PRP, plasma rico em plaquetas; L, laser de baixa intensidade.

A figura 3 mostra o aspecto do terço médio da raiz dos incisivos do grupo controle (sem intervenção), e dos grupos experimentais imediatamente e 30 dias após o reimplante.

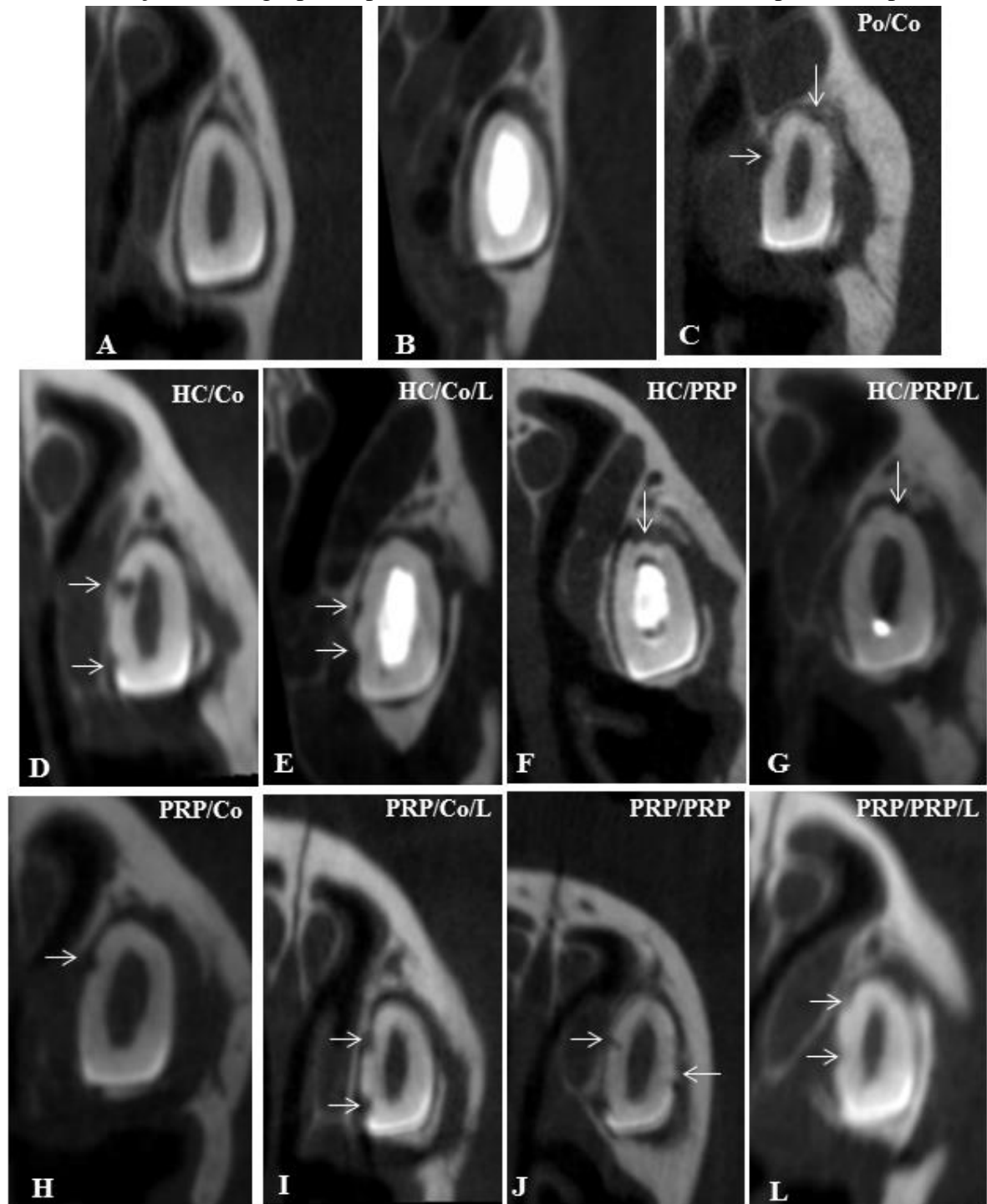


Figura 3 - Imagens microtomográficas no plano transaxial da porção média de raízes de incisivos superiores direitos de ratos do grupo controle (A), representativa de todos os grupos experimentais imediatamente após o reimplante (B) e 30 dias após o reimplante nos grupos Po/Co (C), HC/Co (D), HC/Co/L (E), HC/PRP (F), HC/PRP/L (G), PRP/Co (H), PRP/Co/L (I), PRP/PRP (J) e PRP/PRP/L (L). Po, polpa; Co, coágulo; HC, hidróxido de cálcio; PRP, plasma rico em plaquetas; L, laser de baixa intensidade. As setas indicam as regiões de reabsorção radicular. Fonte: Autoria própria.

DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar por meio de análise microtomográfica *in vivo*, os efeitos da laserterapia, da aplicação do PRP e associação de ambos sobre incisivos superiores de ratos reimplantados tardiamente. O modelo experimental utilizando incisivos superiores de ratos para avaliar o reimplante dentário tem sido constantemente utilizado (10-12, 16, 17). Estudos recentes têm utilizado a micro-ct para avaliar a reabsorção radicular em dentes de ratos reimplantados. No entanto, nestes estudos não houve comparação entre a condição inicial (imediatamente após o reimplante) e após os períodos de avaliação no mesmo animal, uma vez que o escaneamento microtomográfico foi realizado apenas após sacrifício dos animais (2, 16, 17). No presente estudo, foram realizados dois escaneamentos *in vivo* para cada animal; o primeiro imediatamente após o reimplante dentário (inicial) e o segundo após 30 dias (final). Isso permitiu utilizar a técnica de sobreposição das imagens inicial e final e o uso da mesma ROI para determinar o volume inicial de dentina radicular do dente reimplantado e o volume de dentina após o período de 30 dias, obtendo-se assim, a porcentagem de volume de dentina/tecido mineralizado reabsorvida em cada incisivo superior. É importante salientar que sobreposição das imagens e análise comparativa dos volumes dentinário e cementário inicial e final foi possível devido à remoção da papila dentária e do órgão do esmalte dos incisivos, o que interrompe a sua erupção (12, 13).

Em casos onde o dente não possa ser reimplantado imediatamente, a *International Association of Dental Traumatology (IADT)* indica que o dente deve permanecer em um meio de armazenamento com osmolaridade balanceada, como solução balanceada de Hank's (HBSS), solução salina, saliva ou leite (21). No presente estudo, os dentes foram mantidos em leite bovino desnatado por 40 minutos em temperatura ambiente (12). O leite apresenta grande aceitação (22) porque mantém a viabilidade das células do ligamento periodontal, apresenta osmolaridade fisiológica (230–270 mOsm Kg⁻¹), pH próximo ao neutro (6,5 – 6,8)

e baixa contaminação microbiana devido o processo de pausterização (23). Estudo mostrou que o leite com menor teor de gordura pode ser mais apropriado para manter as células do ligamento periodondontal viáveis em comparação com o leite integral, que possui maior teor de gordura (24). Além disso, o leite sem refrigeração é mais comumente encontrado próximo ao local do acidente (1-3).

Cada animal recebeu uma dose intramuscular de antibiótico para controlar a contaminação bacteriana da superfície do dente exposta e para evitar interferência na reabsorção radicular (21,25). Os animais foram sacrificados 30 dias após o reimplante, pois, os processos inflamatórios e de reparo em ratos ocorrem entre 2 e 4 semanas após a reimplantação (26).

A laserterapia foi empregada com o objetivo de modular o processo inflamatório que ocorre após o reimplante dentário e acelerar o reparo (11,13). Os efeitos bioestimulatórios do LBI estão relacionados com o aumento da atividade enzimática, transporte de elétrons e síntese de ATP, que são favoráveis para as reações metabólicas que ocorrem nas células durante o processo de cicatrização (27). O LBI utilizado foi o infravermelho GaAlAs com comprimento de onda de 808 nm, devido ao seu maior potencial de penetração atuando sobre tecidos mais profundos (27) e devido ao tecido alvo, já que a irradiação da superfície radicular com LBI infravermelho melhorou o reparo do ligamento periodontal de dentes de ratos reimplantados (12, 13). Considerando que os incisivos superiores de ratos, apresentam a face vestibular totalmente revestida por esmalte e que o ligamento periodontal está localizado apenas nas faces palatina, mesial e distal, a irradiação com LBI foi realizada apenas na face palatina, além da aplicação no alvéolo.

No presente estudo não houve diferença na reabsorção radicular entre os grupos HC/Co e HC/Co/L, ou seja, o uso do LBI não afetou o reparo pós reimplante quando apenas o coágulo foi mantido no alvéolo. Estes achados diferem daqueles de Vilela et al. (11) que

mostraram que os dentes que receberam irradiação com LBI apresentaram menos reabsorção radicular do que aqueles que não receberam, demonstrando que o efeito anti-inflamatório do LBI pode ter ajudado a reduzir o processo de reabsorção. Apesar de diferenças nos parâmetros da laserterapia, nossos resultados foram semelhantes aos observados por Saito et al., (10), onde não foi observada melhora no reparo periodontal após aplicação do LBI infravermelho no alvéolo dentário e vermelho na superfície radicular.

O PRP apresenta altas concentrações de fatores de crescimento liberados pelas plaquetas ativadas, sendo capaz de iniciar e modular a cicatrização (28). Estudo mostrou os casos que receberam aplicação de PRP dentro do alvéolo dentário previamente ao reimplante apresentaram menor porcentagem de reabsorção radicular inflamatória quando comparado ao reimplante na ausência de PRP (4). No entanto, no presente estudo, na presença de hidróxido de cálcio intracanal, a aplicação de PRP no alvéolo não alterou a taxa de reabsorção radicular quando comparado ao grupo que não recebeu o PRP (HC/Co).

Além da avaliação do efeito do LBI e do PRP empregados individualmente, avaliamos também a associação desses dois tratamentos em reimplante dentário tardio com o intuito de aumentar o potencial reparador do PRP. Para o melhor de nosso conhecimento esta é a primeira vez que esta associação é testada em reimplantes dentários. Embora haja relato da sua aplicação em defeitos periodontais (5), não há até o momento na literatura estudos quanto ao efeito da associação do PRP e a laserterapia em reimplante dentário tardio, onde esse estudo é pioneiro. A inserção de PRP dentro do alvéolo dentário associado à irradiação com LBI, seja com PRP ou com hidróxido de cálcio intracanal, levou a menores porcentagens de reabsorção radicular (Grupos HC/PRP/L e PRP/PRP/L). Esses resultados podem ser devido à ativação de plaquetas pelo laser (29), o que estimula a produção de fatores de crescimento (5), acelerando o reparo do ligamento periodontal com consequente redução das regiões radiculares reabsorvidas. Nagata et al. (5) mostraram que o uso do LBI e do PRP levaram a

formação de novo cemento e de ligamento periodontal funcional em defeitos periodontais criados na mandíbula de ratos, porém sem diferença estatisticamente significativa dos grupos nos quais foi utilizado somente o PRP ou somente o LBI.

Pode-se concluir que o PRP ou do LBI empregados isoladamente, não ofereceram melhora significativa nos índices de reabsorção radicular de dentes de rato reimplantados tardiamente. Por outro lado, os grupos que foram tratados com a associação do PRP no alvéolo e com a irradiação com LBI, independentemente do material usado endodonticamente, apresentaram menor reabsorção radicular em relação ao tratamento convencional, com hidróxido de cálcio intracanal e coágulo no alvéolo. Assim, a associação PRP e LBI pode se constituir em um protocolo promissor de tratamento de dentes reimplantado tardiamente.

REFERÊNCIAS

- 1 Santos CLV, Sonoda CK, Poi WR, Panzarini SR, Sundefeld MLMM, Negri MR. Delayed replantation of rat teeth after use of reconstituted powdered milk as a storage medium. *Dental Traumatol* 2009;25:51-7.
- 2 Reis MVP, Moura CCG, Soares PBF, 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;40:665-9.
- 3 Ricieri CB, Sonoda CK, Aranega AM, Panzarini SR, Poi WR, Sundefeld MLMM et al. Healing process of incisor teeth of diabetic rats replanted after storage in milk. *Dent Traumatol* 2009;25:284-9.
- 4 Assunção LRS, Colenci R, do Amaral CCF, Sonoda CK, Bomfim SRM, Okamoto R et al. Periodontal tissue engineering after tooth replantation. *J Periodontol* 2011;82:758-66.
- 5 Nagata MJ, de Campos N, Messora MR, Pola NM, Santinoni CS, Bomfim SR et al. Platelet-rich plasma, low-level laser therapy, or their combination promotes periodontal regeneration in fenestration defects: a preliminary in vivo study. *J Periodontol* 2014;85:770-8
- 6 Priya HP, Tambakad PB, Naidu J. Pulp and periodontal regeneration of an avulsed permanent mature incisor using platelet-rich plasma after delayed replantation: a 12-month clinical case study. *J Endod* 2016;42:66-71.
- 7 Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:489-96.
- 8 Anila S, Nandakumar K. Applications of platelet rich plasma for regenerative therapy in periodontics. *Trends Biomater Artif Organs* 2006;20:78-83.

- 9 Kawase T. Platelet-rich plasma and its derivatives as promising bioactive materials for regenerative medicine: basic principles and concepts underlying recent advances. *Odontology* 2015;103:126–35.
- 10 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;27:30-9.
- 11 Vilela RG, Gjerde K, Frigo L, Leal-Junior ECP, Lopes-Martins RAB, 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* 2011;27:551-7.
- 12 Carvalho FB, Andrade AS, Barbosa AFS, Aguiar MC, Cangussu MCT, Pinheiro ALB et al. Evaluation of laser phototherapy (λ 780 nm) after dental replantation in rats. *Dent Traumatol* 2016;32:488-94.
- 13 Matos FS, Godolphim FJ, Correia AMO, Albuquerque-Junior RLC, Paranhos LR, Rode SM et al. Effect of laser photobiomodulation on the periodontal repair process of replanted teeth. *Dental Traumatol* 2016;32:402–8.
- 14 Saygun I, Nizam N, Ural AU, Serdar MA, Avcu F, Tözüm TF. Low-level laser irradiation affects the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin-like growth factor-I (IGF-I), and receptor of IGF-I (IGFBP3) from osteoblasts. *Photomed Laser Surg* 2012;30:149-54.
- 15 Raldi DP, Mello I, Neves ACC, Habitante SM, Miyagi SSP, Lage-Marques JL. Attachment of cultured fibroblasts and ultrastructural analysis of simulated cervical resorptions treated with high-power lasers and MTA. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109:154–61.

- 16 Marão HF, Mao JJ, Casatti CA, Coelho Pg, Ervolino E, Zhou J et al. Effects of ovariectomy on periodontal tissues following tooth replantation. *Archives of Oral Biology* 2016;65:9-16.
- 17 Furfaro F, Ang ES, Lareu RR, Murray K, Goonewardene M. A histological and micro-CT investigation in to the effect of NGF and EGF on the periodontal, alveolar bone, root and pulpal healing of replanted molars in a rat model – a pilot study. *Prog Orthod* 2014;6:15-2.
- 18 Cavanaugh D, Johnson E, Price RE, Kurie J, Travis EL, Cody DD. In vivo respiratory-gated micro-CT imaging in small-animal oncology models. *Mol Imaging*. 2004;3:55-62.
- 19 Kalatzis-Sousa NG, Spin-Neto R, Wenzel A, Tanomaru-Filho M, Faria G. Use of micro-computed tomography for the assessment of periapical lesions in small rodents: a systematic review. *Int Endod J* 2017;50:352-66.
- 20 Ahlowalia MS, Patel S, Anwar HM, Cama G, Austin RS, Wilson R, et al. Accuracy of CBCT for volumetric measurement of simulated periapical lesions. *Int Endod J* 2013;46(6): 538-46.
- 21 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;28:88–96.
- 22 Wang WJ, Zhao YM, Feng XY, Jia WQ, Ge LH. Effect of skimmed pasteurized milk and Hank’s balanced salt solution on viability and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Dental Traumatol* 2013;29:365-71.
- 23 Blomlöf L, Otteskog P, Hammarstrom L. Effect of storage in media with different ion strengths and osmolalities on human periodontal ligament cells. *Scand J Dent Res* 1981;89:180–7.

- 24 Harkacz OM, Carnes DL, Walker WA. Determination of periodontal ligament cell viability in the oral rehydration fluid gatorade and milks of varying fat content. *J Endod* 1997;23:687-90.
- 25 Hammarström L, Blomlöf L, Feiglin B, Anderson L, Lindskog S. Replantation of teeth and antibiotic treatment. *Endod Dent Traumatol*. 1986; 2(2): 51-7.
- 26 Panzarini SR, Okamoto R, Poi WR, Sonoda CK, Pedrini D, Da Silva PE et al. Histological and immunohistochemical analyses of the chronology of healing process after immediate tooth replantation in incisor rat teeth. *Dent Traumatol* 2013;29:15-22.
- 27 Karu T. Laser biostimulation: a photobiological phenomenon. *J Photochem & Photobiol B* 1989;3:638-40.
- 28 Everts PA, Knappe JT, Weibrich G, Schönberger JP, Hoffmann J, Overdevest EP et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: A review. *J Extra Corpor Technol* 2006;38:174-87.
- 29 Gresner P, Watala C, Sikurova L. The effect of green laser light irradiation on whole blood platelets. *J Photochem & Photobiol B* 2005;79:43–50.

5 CONCLUSÃO

As condições inerentes ao desenvolvimento dos estudos relativos aos capítulos 1 e 2 nos permitem concluir que:

- Histologicamente, quando o coágulo foi deixado no alvéolo, nenhum dos tratamentos ofereceu melhora significativa nos índices de reabsorção radicular, exceto o grupo que recebeu o PRP intracanal associado à irradiação laser, cuja reabsorção foi significativamente menor que o grupo que recebeu o tratamento convencional (hidróxido de cálcio intracanal e coágulo no alvéolo), por outro lado, a inserção do PRP no alvéolo, independentemente da associação ao laser ou do tratamento intracanal, sempre ofereceu índices de reabsorção menores que o grupo com tratamento convencional;
- À análise histoquímica, não houve diferença entre os grupos estudados quanto ao número de clastos na superfície radicular;
- De acordo com as imagens microtomográficas, o emprego do PRP ou do LBI isoladamente, não ofereceu melhora significativa nos índices de reabsorção radicular de dentes de rato reimplantados tardiamente. Por outro lado, os grupos que foram tratados com a associação do PRP no alvéolo e com a irradiação com LBI, independentemente do material usado endodonticamente, apresentaram menor reabsorção radicular em relação ao tratamento convencional, com hidróxido de cálcio intracanal e coágulo no alvéolo.
- A associação PRP e LBI pode se constituir em um protocolo promissor para o tratamento de dentes reimplantado tardiamente.

REFERÊNCIAS*

- 1 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.
- 2 Andreassen JO, Andressen FM. Avulsões. In: Andreasen JO, Andreasen FM, Andersson L. eds. *Texto e atlas colorido de traumatismo dental*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed Editora; 2001. p. 383-425.
- 3 Anila S, Nandakumar K. Applications of platelet rich plasma for regenerative therapy in periodontics. *Trends Biomater Artif Organs*. 2006; 20(1): 78-83.
- 4 Anitua E, Troya M, Orive G. An autologous platelet-rich plasma stimulates periodontal ligament regeneration. *J Periodontol*. 2013; 84(11): 1556-66.
- 5 Assunção LRS, Colenci R, do Amaral CCF, Sonoda CK, Bomfim SRM, Okamoto R, et al. Periodontal tissue engineering after tooth replantation. *J Periodontol*. 2011; 82(5): 758-66.
- 6 Bastos JV, Cortes MIS, Goulart EMA, Colosimo EA, Gomez RS, Dutra WO. Age and timing of pulp extirpation as major factors associated with inflammatory root resorption in replanted permanent teeth. *J Endod*. 2014; 40(3): 366-71.
- 7 Carvalho ER, Costa FTS, Campos MS, Anbinder AL, Neves ACC, Habitante SM, et al. Root surface treatment using diode laser in delayed tooth replantation: radiographic and histomorphometric analyses in rats. *Dent Traumatol*. 2012; 28(6): 429-36.
- 8 Carvalho FB, Andrade AS, Barbosa AFS, Aguiar MC, Cangussu MCT, Pinheiro ALB, et al. Evaluation of laser phototherapy ($\lambda 780$ nm) after dental replantation in rats. *Dent Traumatol*. 2016; 32(6): 488-94.
- 9 Consolaro A. Nomenclatura e classificação das reabsorções dentárias. In: Consolaro A. eds. *Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas*. 3. ed. Maringá: Dental Press; 2012; p. 39-76.
- 10 Finucane D, KinironsMJ. External inflammatory and replacement resorption of luxated, and avulsed replanted permanent incisors: a review and case presentation. *DentTraumatol*. 2003; 19(3): 170-4.

* * De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-marco-2015.pdf>

- 11 Furfaro F, Ang ES, Lareu RR, Murray K, Goonewardene M. A histological and micro-CT investigation in to the effect of NGF and EGF on the periodontal, alveolar bone, root and pulpal healing of replanted molars in a rat model – a pilot study. *Prog Orthod*. 2014; 15(1): 2.
- 12 Kalatzis-Sousa NG, Spin-Neto R, Wenzel A, Tanomaru-Filho M, Faria G. Use of micro-computed tomography for the assessment of periapical lesions in small rodents: a systematic review. *Int Endod J*. 2017; 50(4): 352-66.
- 13 Kawase T. Platelet-rich plasma and its derivatives as promising bioactive materials for regenerative medicine: basic principles and concepts underlying recent advances. *Odontology*. 2015; 103(2): 126–35.
- 14 Komatsu K, Shimada A, Shibata T, Shimoda S, Oida S, Kawasaki K, et al. Long-term effects of local pretreatment with alendronate on healing of replanted rat teeth. *J Periodont Res*. 2008; 43(2): 194–200.
- 15 Law AS. Considerations for regeneration procedures. *J Endod*. 2013; 39(3S): S44-56.
- 16 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.
- 17 Marão HF, Mao JJ, Casatti CA, Coelho Pg, Ervolino E, Zhou J, et al. Effects of ovariectomy on periodontal tissues following tooth replantation. *Arch Oral Biol*. 2016; 65: 9-16.
- 18 Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004; 62(4): 489-96.
- 19 Matos FS, Godolphim FJ, Correia AMO, Albuquerque-Junior RLC, Paranhos LR, Rode SM, et al. Effect of laser photobiomodulation on the periodontal repair process of replanted teeth. *Dent Traumatol* 2016; 32(5):402-8.
- 20 Melcher AH. Cells of periodontium: their role in the healing of wounds. *Ann R Coll Surg Engl*. 1985;67(2):130–1.
- 21 Mendonça JP. Estudo histológico da ação do plasma rico em plaquetas, associado ou não ao laser de baixa potência, a cicatrização por primeira intenção, em ratos Wistar.[Dissertação] Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2009.

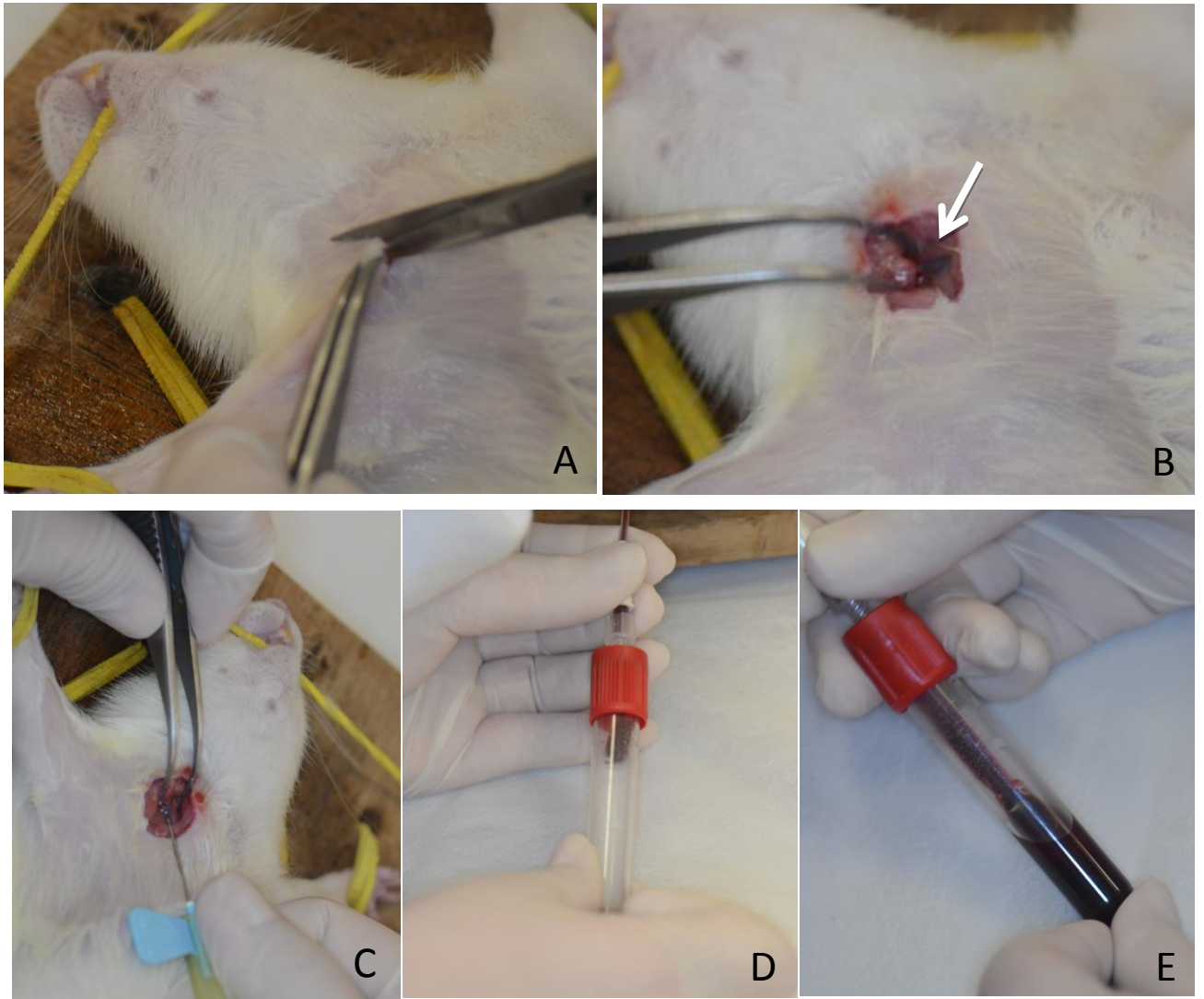
- 22 Nagata MJ, de Campos N, Messoria MR, Pola NM, Santinoni CS, Bomfim SR, et al. Platelet-rich plasma, low-level laser therapy, or their combination promotes periodontal regeneration in fenestration defects: a preliminary in vivo study. *J Periodontol*. 2014; 85(6): 770-8
- 23 Panzarini SR, Okamoto R, Poi WR, Sonoda CK, Pedrini D, Da Silva PE, et al. 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.
- 24 Pearson RM, Liewehr FR, West LA, Patton WR, McPherson JC, Runner RR. Human periodontal ligament cell viability in milk and milk substitutes. *J Endod*. 2003; 29(3): 184-6.
- 25 Priya HP, Tambakad PB, Naidu J. Pulp and periodontal regeneration of an avulsed permanent mature incisor using platelet-rich plasma after delayed replantation: a 12-month clinical case study. *J Endod*. 2016; 42(1): 66–71.
- 26 Raldi DP, Mello I, Neves ACC, Habitante SM, Miyagi SSP, Lage-Marques JL. Attachment of cultured fibroblasts and ultrastructural analysis of simulated cervical resorptions treated with high-power lasers and MTA. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 109(2): e154–61.
- 27 Reis MVP, Moura CCG, Soares PBF, 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(5): 665-9.
- 28 Ricieri CB, Sonoda CK, Aranega AM, Panzarini SR, Poi WR, Sundefeld MLMM, et al. Healing process of incisor teeth of diabetic rats replanted after storage in milk. *Dent Traumatol*. 2009; 25(3): 284-9.
- 29 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.
- 30 Santos CLV, Sonoda CK, Poi WR, Panzarini SR, Sundefeld MLMM, Negri MR. Delayed replantation of rat teeth after use of reconstituted powdered milk as a storage medium. *Dent Traumatol*. 2009; 25(1): 51-7.

- 31 Saygun I, Nizam N, Ural AU, Serdar MA, Avcu F, Tözüm TF. Low-level laser irradiation affects the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin-like growth factor-I (IGF-I), and receptor of IGF-I (IGFBP3) from osteoblasts. *Photomed Laser Surg.* 2012 ;30(3):149-54.
- 32 Trope M. Avulsion of permanent teeth: theory to practice. *Dent Traumatol.* 2011;27(4):281-94.
- 33 Vilela RG, Gjerde K, Frigo L, Leal-Junior ECP, Lopes-Martins RAB, Kleine BM, Prokopowitsch 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* 2011; 27(3):551-7.

APÊNDICE

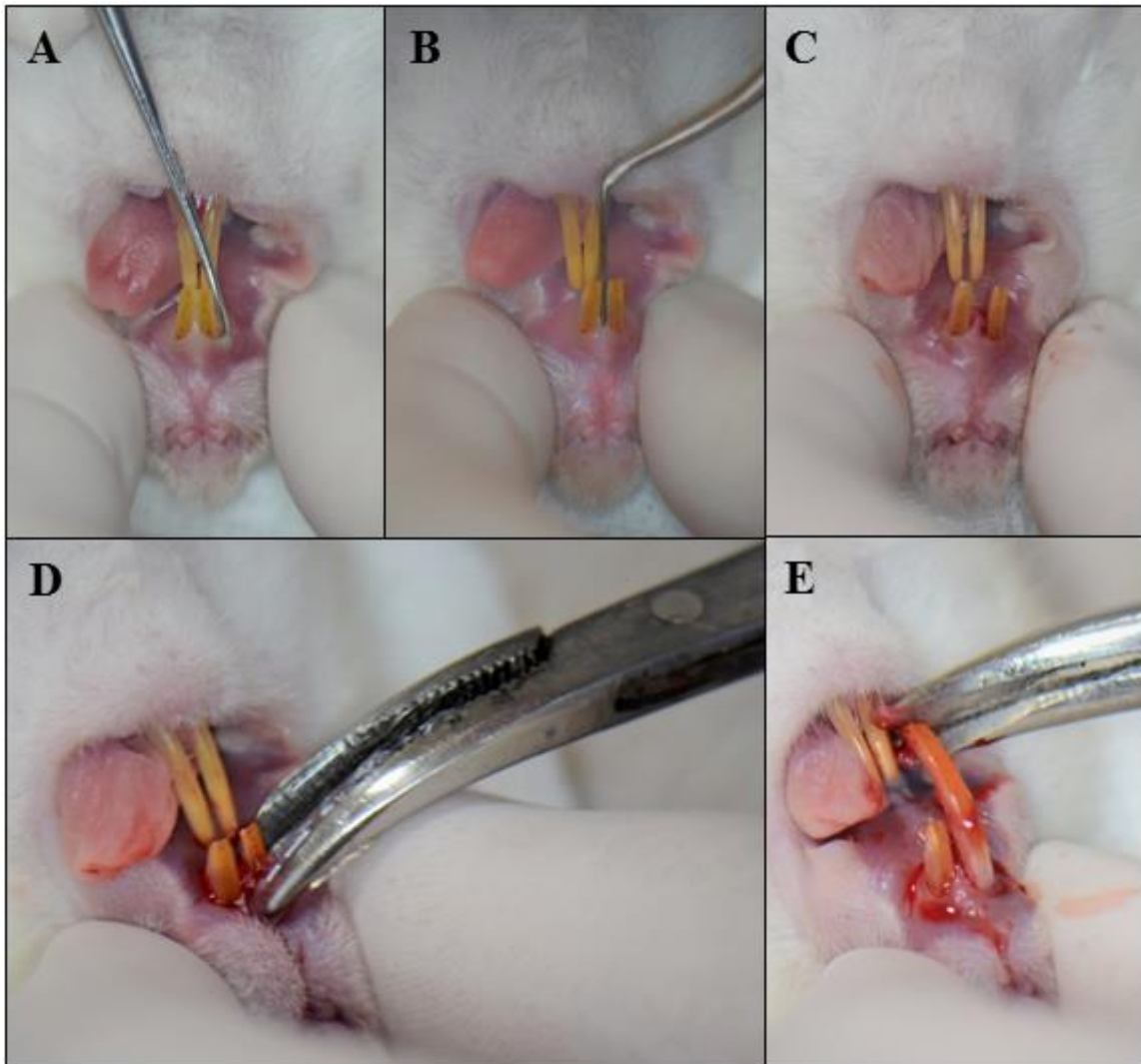
APÊNDICE A – Figuras correspondentes à publicação 1 e 2.

Figura A.1 – Divulsão do tecido (A), Veia jugular (B - seta), Canulação da veia jugular (C) e coleta de sangue (D e E).



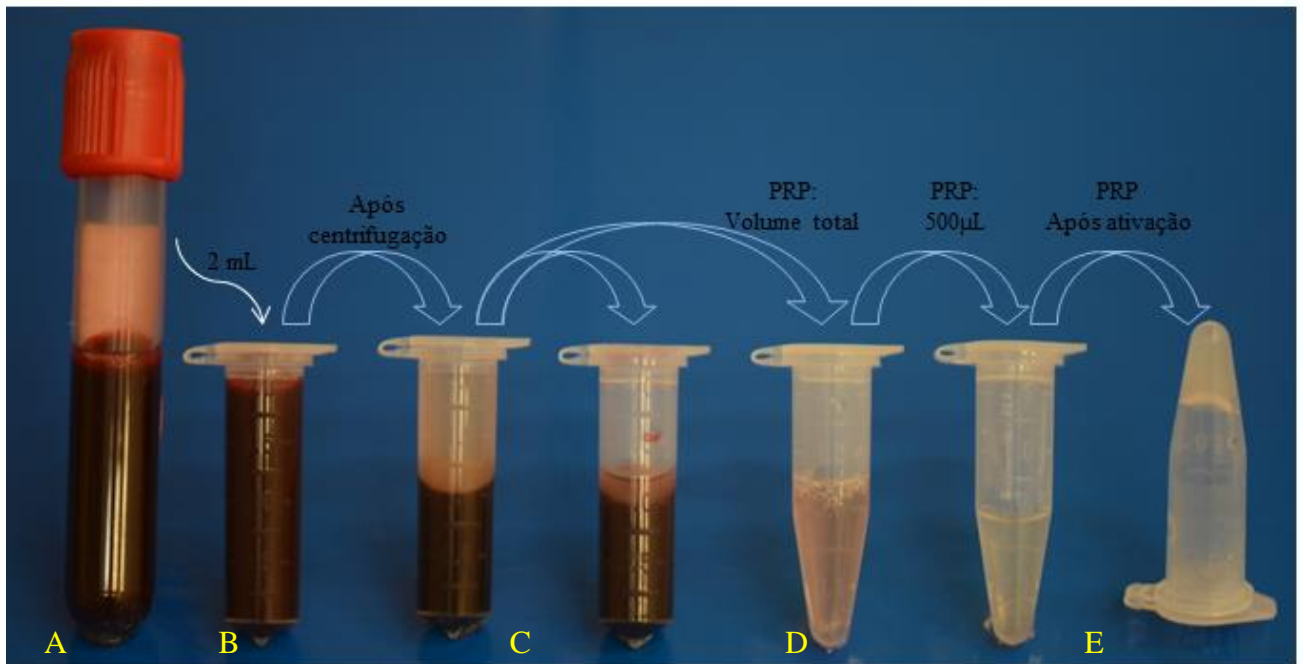
Fonte: Autoria própria.

Figura A.2 – Exodontia do incisivo superior direito - A: sindesmotomia; B: luxação; C: incisivo central após luxação; D e E: extração.



Fonte: Autoria própria.

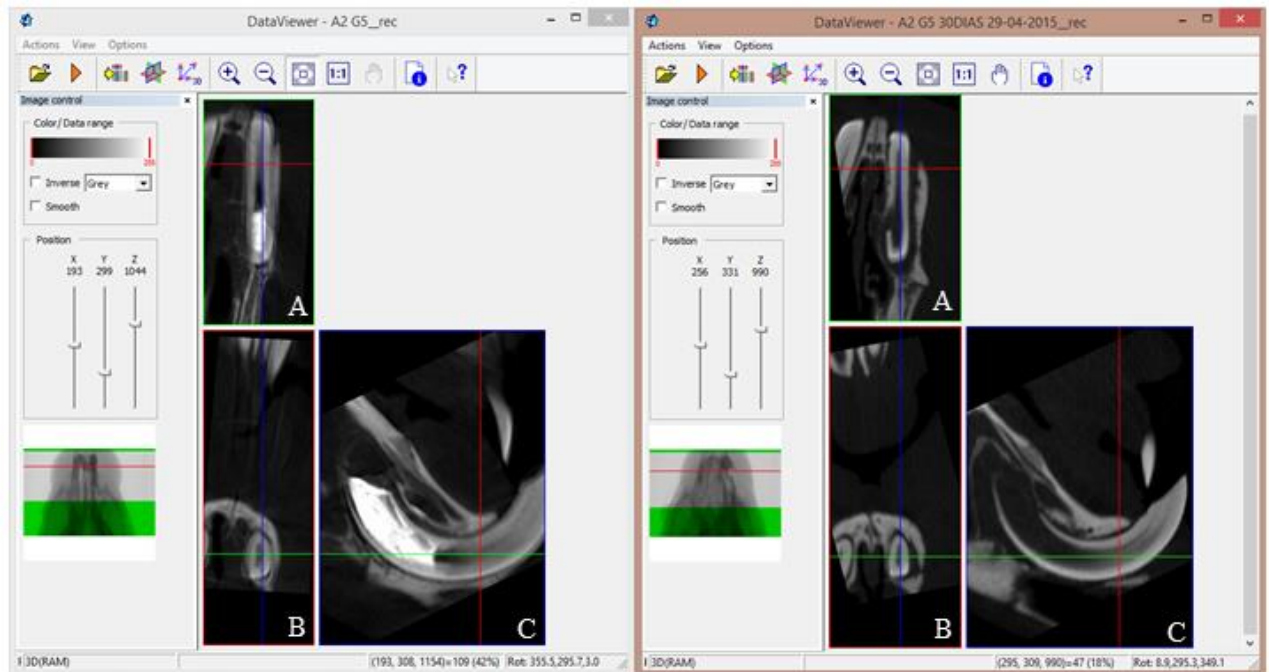
Figura A.3 – Obtenção do PRP – A: coleta inicial, B: 2 mL de sangue acondicionado em ependorf para centrifugação, C: imediatamente após a centrifugação do sangue por 7 minutos, 1200 rpm, 22°C, D: descarte após transferência do volume total de PRP obtido após a centrifugação, E: volume total de PRP obtido após centrifugação, F: 500µL de PRP obtido que foi utilizado para o tratamento do alvéolo dentário ou preenchimento do canal radicular e para contagem das plaquetas, G: PRP após ativação com cloreto de cálcio (500 µL PRP foram ativados com 25 µL cloreto de cálcio a 10%, a figura ilustrada na letra G é uma forma didática para mostrar a forma de gel do PRP após ativação. No entanto, no presente trabalho, o PRP ativado foi inserido no alvéolo e/ou no canal radicular ainda na forma líquida, antes de geleificar).



Fonte: Autoria própria.

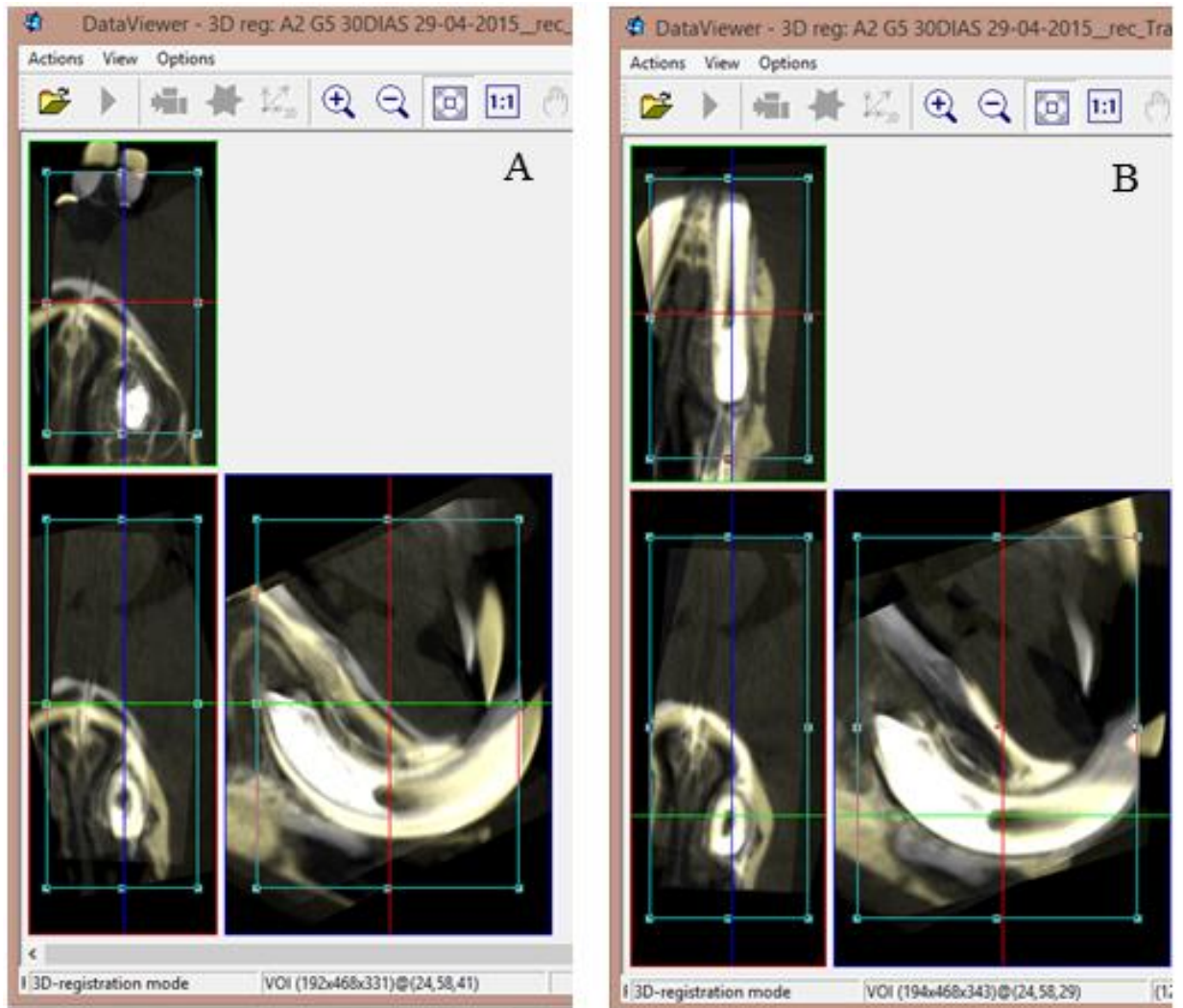
APÊNDICE B – Figuras correspondentes somente à publicação 2.

Figura B.1 - Orientação das imagens microtomográficas nos três planos (A: plano coronal, B: plano transaxial e C: plano sagital). As linhas verde, azul e vermelha, representam os eixos Y, X e z, respectivamente.



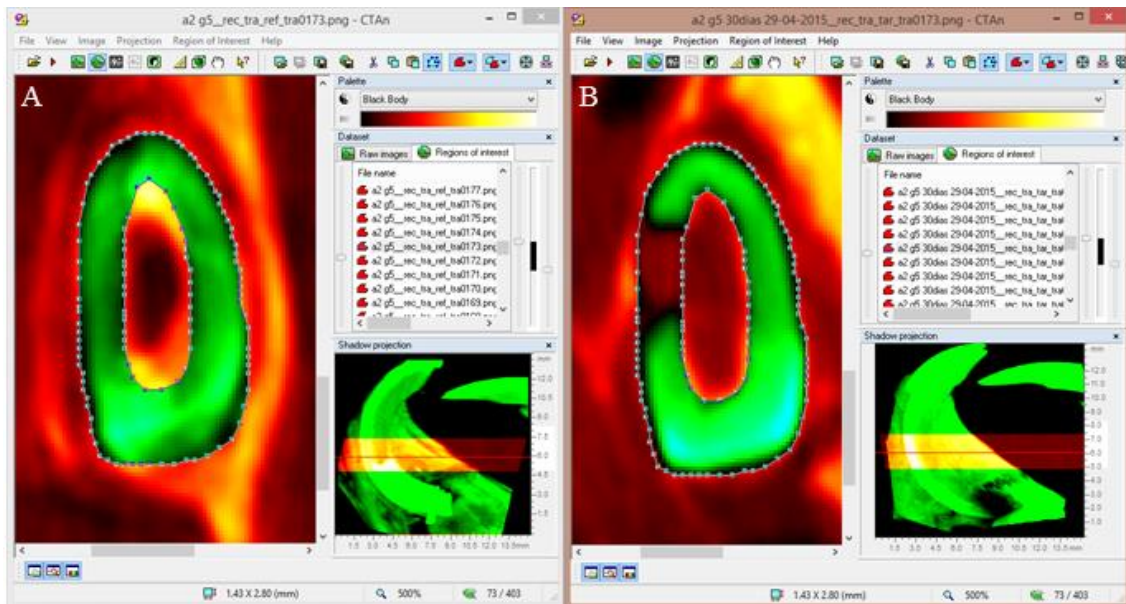
Fonte: Autoria própria.

Figura B.2 - Sobreposição dos registros inicial e após 30 dias desalinhados (A) e após alinhamento geométrico (B).



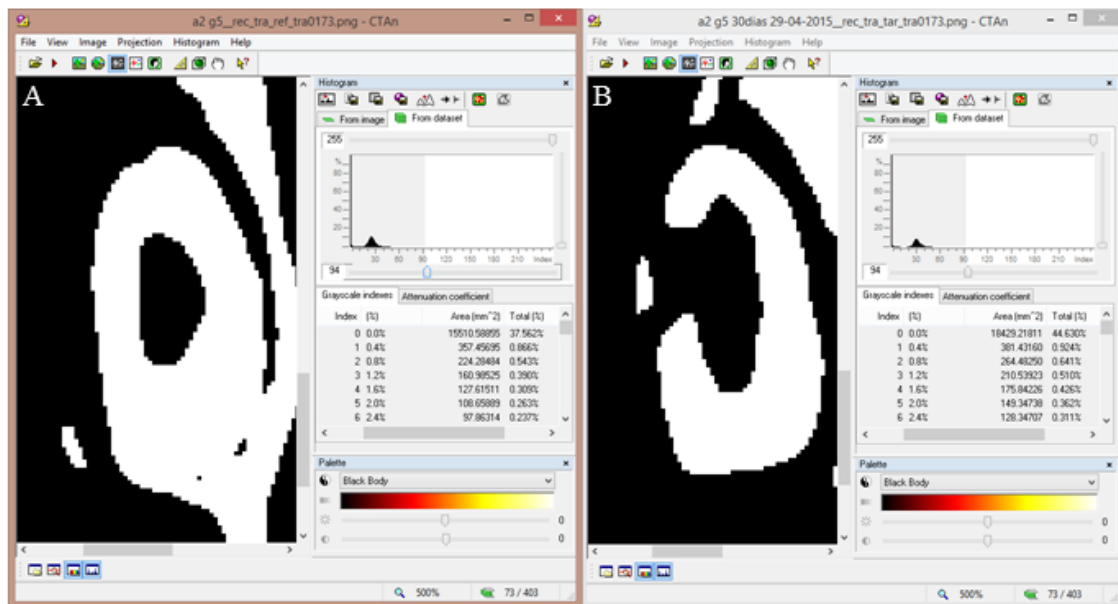
Fonte: Autoria própria.

Figura B.3 - ROI dos espécimes inicialmente (A) e 30 dias após o reimplante dentário (B).



Fonte: Autoria própria.

Figura B.4 - Imagens binárias inicial (A) e 30 dias após o reimplante dentário (B).



Fonte: Autoria própria.

ANEXO A

Aprovação do projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais
(CEUA nº 46/2014)

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



Proc. CEUA nº 46/2014

Araraquara, 19 de dezembro de 2014.

Senhores Pesquisadores:

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA desta Faculdade, em reunião hoje realizada, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado *"EFEITO DA LASERTERAPIA E DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM DENTES REIMPLANTADOS TARDIAMENTE: ANÁLISE HISTOLÓGICA, IMUNOHISTOQUÍMICA E POR MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA"* (Proc. CEUA nº 46/2014) AUTORIZA a realização da pesquisa, ficando a apresentação do RELATÓRIO FINAL, para **FEVEREIRO/2017**.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Débora Simões de Almeida Colombari
Vice-coordenadora da CEUA

Ao
Prof. Dr. FÁBIO LUIZ CAMARGO VILLELA BERBERT
DD, Pesquisador Responsável
Departamento de Odontologia Restauradora

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 17 de março de 2019.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 17 de março de 2017.

ARIELE PATRÍCIA RABELLO