

## RESSALVA

Atendendo solicitação do (a) autor  
(a), o texto completo desta tese será  
disponibilizado a partir de

06/12/2018



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
Campus de São José dos Campos  
Instituto de Ciência e Tecnologia

**MONIQUE COSTA MOREIRA FRANÇA**

**INFLUÊNCIA DO EDTA E ÁCIDO HIALURÔNICO NA VIABILIDADE E  
EXPRESSÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS DE FIBROBLASTOS DO  
LIGAMENTO PERIODONTAL**

2017

**MONIQUE COSTA MOREIRA FRANÇA**

**INFLUÊNCIA DO EDTA E ÁCIDO HIALURÔNICO NA VIABILIDADE E  
EXPRESSÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS DE FIBROBLASTOS DO  
LIGAMENTO PERIODONTAL**

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade de Endodontia.

Orientador: Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo

Co-Orientadora: Prof. Titular Marcia Carneiro Valera

São José dos Campos

2017

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera** (co-orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Profa. Dra. Gleyce Oliveira Silva**

Universidade Nove de Julho (Uninove)

**Profa. Dra. Adriana de Jesus Soares**

Universidade de Campinas (Unicamp)

Faculdade de Odontologia de Piracicaba

**Prof. Adj. Eduardo Bresciani**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Prof. Adj. Cláudio Antonio Talge Carvalho**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 06 de Dezembro de 2017.

## DEDICATÓRIA

Primeiramente à **Deus** por me dar força e serenidade para seguir em frente e ultrapassar todos os obstáculos.

Aos meus pais, **Edmar Moreira** e **Ana Elizabeth Costa Moreira**, pelo carinho e dedicação. Não há palavras suficientes para agradecer-lhes por tudo de bom que ambos fizeram e ainda fazem por mim. É por vocês que me dedico e sigo em frente.

Ao meu marido, **Fernando Antônio Ebum de Siqueira França**, pelo carinho, paciência e dedicação. Ao meu lado tornou minha caminhada mais suave, sempre me dando forças e compreendendo os momentos de ausência.

Aos meus filhos **Eduardo** e **Sofia** que vieram para transformar a minha vida. Além de me tornarem mãe, ensinam a cada dia o poder transformador do amor incondicional, sem o qual eu não conseguiria estar aqui terminando mais uma etapa.

Às minhas irmãs, **Amanda**, **Paloma** e **Tatiana**, pelo carinho e alegria mesmo nos momentos mais difíceis e fatigantes. Sem vocês eu não teria conseguido.

À minha grande amiga **Tânia Mara da Silva**, que está comigo desde a graduação, nunca me abandonou. Minha irmã de coração e alma. Temos uma ligação forte e de muito respeito, sempre torcendo para sermos felizes naquilo que nos proponhamos a fazer. Muito obrigada por fazer parte da minha vida.

Aos meus cunhados **Christiano Correa Teixeira** e **Tiago Bosqueiro** que me deram apoio seja com palavras ou com ajuda durante todas as fases do meu Doutorado.

Ao meu querido orientador, **Carlos Henrique Ribeiro Camargo**, pelos ensinamentos e pela compreensão nos momentos mais difíceis. Nestes cinco anos entre Mestrado e Doutorado, soube compreender meus momentos de ausência. Saiba que estudar nesta instituição foi uma terapia para mim. Muito obrigada pelo apoio.

A minha querida co-orientadora **Márcia Carneiro Valera**, que desde a graduação e por tantos outros momentos nesta caminhada pela pós-graduação me ensinou a nunca desistir e seguir com minhas metas. Muito obrigada por tudo.

## AGRADECIMENTOS

Aos docentes da Endodontia: Ana Paula Martins Gomes, Cláudio Antonio Talge Carvalho e Frederico Canato Martinho pelos ensinamentos que me foram concedidos.

Aos queridos amigos e amigas da pós-graduação: Alessandra, Amjad, Carlos, Cássia, Cláudia, Daiana, Diego, Estebam, Felipe Matos, Fernanda, Felipe Machado, Lais, Rayana e Tatiane, pela amizade construída durante o curso de Doutorado.  
Pelo companheirismo de cada uma de vocês.

À querida amiga **Gleyce**, pela ajuda e pelo companheirismo de todos os dias. Foi uma das amizades mais sinceras que a pós-graduação me proporcionou.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora.

À **CAPES** pela concessão da bolsa de estudos que tornou possível a realização deste trabalho.

À todos os funcionários que direta ou indiretamente muito contribuíram em meu trabalho e para o convívio diário.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT) -UNESP pelo incentivo durante o desenvolvimento do curso.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE QUADROS.....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>10</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>12</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Tratamento de dentes avulsionados.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1.1 Uso do ácido hialurônico.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1.2 Aplicação de EDTA.....</b>	<b>25</b>
<b>2.1.3 Remoção do ligamento periodontal e tempo de ressecamento da superfície radicular.....</b>	<b>28</b>
<b>2.2 Citocinas inflamatórias.....</b>	<b>32</b>
<b>3 PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1 Preparo dos discos.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1.1 Tratamento dos discos com EDTA e ácido hialurônico.....</b>	<b>39</b>
<b>4.2 Cultivo das células.....</b>	<b>42</b>
<b>4.2.1 Descongelamento.....</b>	<b>43</b>
<b>4.2.2 Troca de meio.....</b>	<b>44</b>
<b>4.2.3 Subcultura.....</b>	<b>44</b>
<b>4.2.4 Contagem de células.....</b>	<b>46</b>
<b>4.2.5 Plaqueamento.....</b>	<b>47</b>
<b>4.3 Viabilidade celular - Ensaio XTT.....</b>	<b>48</b>
<b>4.4 Verificação da adesão celular por MEV.....</b>	<b>49</b>
<b>4.5 Quantificação de citocinas pelo teste de ELISA (ELISA- enzymelinked Immunosorbent assay).....</b>	<b>50</b>
<b>4.6 Análise Estatística.....</b>	<b>55</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
<b>5.1 Viabilidade celular pelo teste de XTT.....</b>	<b>56</b>
<b>5.1.1 Análise descritiva.....</b>	<b>56</b>
<b>5.1.2 Análise Inferencial.....</b>	<b>57</b>
<b>5.1.2.1 Grupo sem ressecamento da superfície radicular.....</b>	<b>57</b>
<b>5.1.2.2 Grupo com 1 hora de ressecamento da superfície radicular.....</b>	<b>58</b>
<b>5.1.2.3 Grupo com 24 horas de ressecamento da superfície radicular.....</b>	<b>60</b>
<b>5.2 Quantificação de citocinas pelo teste de ELISA.....</b>	<b>61</b>



<b>5.3 Imagens ilustrativas da adesão celular por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....</b>	<b>67</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>6.1 Discussão da Metodologia.....</b>	<b>69</b>
<b>6.2 Discussão dos Resultados.....</b>	<b>71</b>
<b>7 Conclusão.....</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>78</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>90</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>91</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Obtenção dos discos de dentina com cimento.....	38
Figura 2 - Padronização da altura dos discos de dentina e cimento.....	38
Figura 3 - Limpeza dos discos em cuba ultrasônica.....	39
Figura 4 – Divisão dos grupos experimentais.....	40
Figura 5 – Tratamento dos discos com EDTA17% e ácido hialurônico.....	41
Figura 6 – Material para cultura de células.....	42
Figura 7 – Descongelamento das células PDLF.....	43
Figura 8 – Subcultivo das células PDLF.....	45
Figura 9 – Preparo para realização da contagem celular.....	46
Figura 10 – Placa de 96 poços com os discos de dentina e cimento.....	47
Figura 11 – Ensaio de XTT.....	48
Figura 12 – Discos para realização de análise por MEV.....	50
Figura 13 – Obtenção do sobrenadante dos discos para o teste de ELISA.....	51
Figura 14 – Placa de 96 poços para o teste de ELISA.....	52
Figura 15 – Preparo da curva padrão para o teste de ELISA.....	53
Figura 16 – Placa de 96 poços com as soluções A+B para o teste de ELISA....	54
Figura 17 – Placa de 96 poços com a solução de stop para o teste de ELISA...	55
Figura 18 – Gráfico de colunas (média±DP) dos valores de viabilidade celular (%) segundo os tratamentos da superfície dos discos dentina/cimento sem ressecamento e com ressecamento de 1h e 24h.....	57
Figura 19 – Gráficos de curva-padrão e média para a IL-1 $\beta$ em células de PDLF..	62
Figura 20 - Gráficos de curva-padrão e média para a IL-6 em células de PDLF.....	63
Figura 21 - Gráficos de curva-padrão e média para a IL-8 em células de PDLF.....	65
Figura 22 - Gráficos de curva-padrão e média para a TNF- $\alpha$ em células de PDLF	66
Figura 23 - Fotografia ilustrativa da adesão de fibroblastos na superfície do cimento nos discos de dentina e cimento dos grupos sem ressecamento, 1 h e 24h de ressecamento. Imagem por MEV - aumento 1000x.....	68

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Citocinas pró-inflamatórias.....	90
---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de média $\pm$ desvio-padrão da viabilidade celular (%) em cada grupo.....	56
Tabela 2 –Resultado do teste ANOVA (Análise de Variância) 1 fator, para o fator viabilidade celular sem ressecamento.....	58
Tabela 3 – Valores de média $\pm$ desvio-padrão da viabilidade celular (%) e resultados do teste de Tukey para o fator tratamento.....	58
Tabela 4 - Resultado do teste ANOVA 1 fator tratamento com 1 hora de ressecamento.....	59
Tabela 5 - Valores de média e desvio-padrão da viabilidade celular (%) e resultados do teste de Tukey para o fator tratamento.....	59
Tabela 6 - Resultado do teste ANOVA 1 fator tratamento com 24 horas de ressecamento.....	60
Tabela 7 - Valores de média (%) e desvio-padrão da viabilidade celular e resultados do teste de Tukey para o fator tratamento.....	60

França M. Influência do ressecamento da superfície radicular, do tratamento com EDTA e ácido Hialurônico na viabilidade e expressão de citocinas inflamatórias de fibroblastos do ligamento periodontal. [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2017.

## RESUMO

O momento ideal para o reimplante de um dente avulsionado é imediatamente após a avulsão, no entanto, isso nem sempre é possível. Uma série de fatores influenciam na viabilidade das células do ligamento periodontal (PDL) contribuindo para acelerar ou minimizar a ocorrência da reabsorção radicular ou anquilose, consequências mais frequentes dos reimplantes. Um destes fatores é o período extra-oral e o tratamento da superfície radicular. O EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) a 17% e o ácido hialurônico (AH) são utilizados para tratar a superfície radicular, visando menor ocorrência de reabsorção inflamatória e por substituição. Sendo assim, os objetivos deste estudo foram: a) avaliar a viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal (PDLF) em contato com discos radiculares submetidos ou não ao ressecamento de superfície por diferentes tempos e tratados com EDTA e/ou AH; b) quantificar as citocinas inflamatórias IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  expressas por PDLF; c) observar a adesão de PDLF na superfície dos discos radiculares tratados. Foram obtidos 108 discos de dentina e cimento da superfície radicular de dentes bovinos, com 4,5 mm de diâmetro, que foram previamente submetidos a dissolução do ligamento periodontal em solução de hipoclorito de sódio 1% por 15 min. Em seguida os discos foram esterilizados em concentrações decrescentes de álcool (100%,90%,80% e 70%). Os espécimes foram submetidos ou não ao ressecamento radicular por 1h ou 24h e tratados com EDTA associado ou não ao ácido hialurônico, colocados em placas de 96 poços onde foram semeadas células de culturas primárias de PDLF, que ficaram em contato com os discos por 48 h. A viabilidade celular na superfície dos discos foi avaliada através do ensaio de XTT. A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para verificar a adesão de PDLF à superfície dos discos. A detecção e quantificação das citocinas foi realizada pelo teste ELISA. Os dados foram submetidos à análise estatística pelo teste ANOVA e Tukey ( $p < 0,05$ ). A maior média foi apresentada no grupo sem ressecamento para o tratamento EDTA+AH (148,39), que diferiu significativamente dos grupos controle e EDTA. No grupo ressecamento 1 h EDTA+AH (144,91) foi diferente dos demais. Para ressecamento 24h, verificou-se que o grupo EDTA+AH diferiu do grupo controle. Não houve modificações na expressão das citocinas IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  quando foi acrescentado os tratamentos propostos. A IL-6 mostrou uma diminuição quando em contato com AH no período de 24h. Foi observada pelo MEV adesão de PDLF na superfície de todos os discos tratados e em todos os períodos analisados. Conclui-se que o ácido hialurônico é uma alternativa de tratamento para casos de dentes avulsionados já que mostrou seu papel promovendo adesão e aumento da viabilidade.

Palavras-chave: Avulsão dentária. Ácido etilenodiaminotetracético. Ensaio de imunoabsorção enzimática.

França MCM. Influence of root surface dryness and treatment with EDTA and Hyaluronic acid on the viability and expression of inflammatory cytokines of periodontal ligament fibroblasts. [thesis]. São José dos Campos (SP): Paulista State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2017.

## ABSTRACT

The ideal time for reimplantation of an avulsed tooth is immediately after avulsion, however, this is not always possible. A number of factors influence the viability of the cells of the periodontal ligament (PDL) contributing to accelerate or minimize the occurrence of root resorption or ankylosis, more frequent consequences of reimplantation. One of these factors is the extra-oral period and root surface treatment. EDTA (17% ethylenediaminetetraacetic acid) and hyaluronic acid (HA) are used to treat the root surface, aiming for a lower occurrence of inflammatory resorption and replacement. Thus, the objectives of this study were: a) to evaluate the viability of periodontal ligament fibroblasts (PDLF) in contact with root disks submitted to surface dryness at different times and treated with EDTA and / or AH; b) quantify the inflammatory cytokines IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  expressed by PDLF; c) observe the adhesion of PDLF on the surface of the treated root discs. 108 dentin and cementum disks were obtained from the root surface of bovine teeth, 4.5 mm in diameter, which were previously submitted to dissolution of the periodontal ligament in 1% sodium hypochlorite solution for 15 min. Then the disks were sterilized in decreasing concentrations of alcohol (100%, 90%, 80% and 70%). The specimens were submitted to root resection for 1 h or 24 h and treated with EDTA, whether or not associated with hyaluronic acid, placed in 96-well plates where cells from PDLF primary cultures were seeded and left in contact with the discs for 48 h. Cell viability at disc surfaces was assessed by the XTT assay. Scanning electron microscopy was used to verify the adhesion of PDLF to the disc surface. Detection and quantification of cytokines was performed by ELISA. Data were submitted to statistical analysis by the ANOVA and Tukey test ( $p < 0.05$ ). The highest mean was presented in the non-dry group for EDTA + AH treatment (148,39), which differed significantly from the control and EDTA groups. In the dryness group 1 h EDTA + AH (144.91) was different from the others. For dryness 24 h, it was found that the EDTA + AH group differed from the control group. There were no changes in the expression of cytokines IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  when the proposed treatments were added. IL-6 showed a decrease when in contact with HA in the 24-hour period. It was observed by the MEV adhesion of PDLF on the surface of all treated discs and in all periods analyzed. It is concluded that hyaluronic acid is an alternative treatment for cases of avulsed teeth since it showed its role promoting adhesion and increased viability.

Keywords: Dental avulsion. Ethylenediaminetetraacetic acid. Enzyme immunoassay.

## 1 INTRODUÇÃO

Dentre as lesões traumáticas que podem ocorrer na dentição permanente, a avulsão dentária é o tipo mais grave, pois provoca danos em várias estruturas responsáveis pelo suporte do dente no seu alvéolo (Lopes, Siqueira Jr., 2010). A avulsão resulta no deslocamento completo do dente de seu alvéolo, com o rompimento do ligamento periodontal, acarretando danos ao cemento e as células aderidas a ele (Andreasen, 1981; Flores et al., 2001).

De acordo com Bastone (2000) a avulsão corresponde de 1 a 16% das lesões e ocorre mais frequentemente entre as idades de 7 a 14 anos, afetando principalmente os incisivos centrais superiores. É importante que o cirurgião-dentista tenha conhecimento dos protocolos de tratamento para dentes traumatizados, a fim de que se realize o tratamento mais rápido possível e de maneira adequada, aumentando a chance de sucesso destes casos (Trope, 2002).

A Associação Internacional de Traumatologia Dental (IADT) propõe um guia atualizado em 2012 para orientar os profissionais a adotar o melhor tratamento de acordo com as condições presentes na situação traumática. A escolha do tratamento está relacionada à maturidade da raiz (ápice aberto ou fechado) e à condição das células do ligamento periodontal. A condição das células depende do tipo de armazenamento deste dente e o tempo que ficou fora da boca até o seu reimplante. Após um tempo seco de 60 min ou mais, todas as células PDL não são viáveis. A fim de diminuir a substituição óssea do dente, a superfície radicular deve ser tratada com solução de fluoreto de sódio 2 % por 20 min antes do reimplante.

Idealmente, um dente que sofreu avulsão, deve ser reimplantado imediatamente, mas em muitos casos isso não acontece, devido à falta de conhecimento de pais e responsáveis de como proceder diante da urgência, seja de como armazenar este dente ou o período que deva procurar o cirurgião-dentista.

Diante da impossibilidade de reimplante imediato, o dente deve ser mantido em meio úmido, para a manutenção da vitalidade das células do ligamento periodontal

(Flores et al., 2001). Os principais meios de armazenamento até hoje utilizados são: a Solução Salina Balanceada de Hank`s (SSBH), saliva, leite e água (Sigalas et al., 2004). O meio de armazenamento ideal deve ter osmolaridade fisiológica, pH adequado e nutrientes para permitir a sobrevivência das células do LP, mas até o momento não há evidências suficientes para determinar o melhor meio de armazenamento para se conseguir um reimplante bem-sucedido (Longo et al., 2017).

Portanto, o reimplante de um dente avulsionado deve, sempre que possível, ser imediato evitando o ressecamento da superfície radicular e assim aumentando as possibilidades das células do ligamento periodontal se repararem (Andreasen, 1981; Soder et al. 1977), uma vez que irão manter a sua viabilidade, favorecendo a regeneração das mesmas (Trope, 1998).

Quando há demora no reimplante com ressecamento excessivo da superfície radicular, as células do ligamento periodontal serão danificadas o que irá provocar uma resposta inflamatória difusa no tecido em contato com a superfície radicular (Trope et al., 2011). Em um primeiro momento, áreas de necrose, acúmulo de sangue e um exsudato inflamatório se formam entre as fibras do ligamento periodontal e no espaço ocupado por ele (Saito et al., 2011).

Devido a essa resposta inflamatória os cementoblastos se dirigem mais lentamente para a superfície radicular podendo não cobrir totalmente esta região, permitindo que células ósseas cheguem a estas áreas promovendo a anquilose e, possivelmente, pode se iniciar uma reabsorção substitutiva pelo processo de remodelação óssea (Andreasen, 1966; Trope, 1998; Lopes e Siqueira Jr. 2010; Trope et al., 2011).

Além disso, as células do ligamento periodontal podem sofrer necrose e, nestes casos, o tecido de granulação pode ser substituído por tecido ósseo e iniciar o processo de reabsorção, que na presença de microrganismos pode se tornar uma reação inflamatória (Panzarini et al., 2008).

Sendo assim, no reimplante os fatores mais importantes para acelerar ou minimizar a ocorrência da reabsorção radicular ou anquilose são o período de exposição extra-oral e o meio de armazenamento do dente avulsionado (Mori et al., 2007).



Quanto ao tempo extra-oral do dente avulsionado, se este for maior que 15 a 20 min sem umidade, as células do ligamento periodontal provavelmente não estarão mais viáveis e a raiz deve ser tratada para minimizar as prováveis consequências deste ressecamento (Trope, 2011). Para limitar ou prevenir a reabsorção radicular e promover o reparo dos tecidos, o dente submetido ao reimplante tardio deve receber um tratamento na superfície radicular e iniciar a terapia endodôntica (Mori et al., 2013).

O sal trissódico de EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) é um quelante com propriedades lubrificantes (Çalt, Serper, 2002), que leva molhabilidade para a superfície dentinária e vem sendo estudado como promotor da adesão celular sobre superfícies de raízes dentárias nos processos de avulsão e reimplante tardio simulados (Pang et al., 2014).

O EDTA pode ser usado na superfície radicular na tentativa de reestabelecer a biocompatibilidade das raízes atuando como agente condicionador (Prasad et al., 2012), e também auxilia na liberação de fatores de crescimento derivados da dentina, capazes de induzir a proliferação, a diferenciação e a sobrevivência celular (Roberts-Clark, Smith, 2000)

Vários biomateriais naturais e sintéticos também têm sido investigados para o uso na regeneração dos tecidos que sofreram alguma injúria e que possuem baixo potencial de recuperação com sequelas previsíveis, tais como scaffolds, componentes da matriz extracelular, hidrogéis e biocerâmicos (Galler et al., 2011; Mooney et al., 1996; Bohl et al., 1998; Srisuwan et al., 2013; Huang et al., 2010; Prescott et al., 2008).

Um biomaterial promissor no campo da engenharia de tecidos e medicina regenerativa é o ácido hialurônico (HA), também chamado de hialuronano e seus derivados, obtidos por esterificação do HA com diferentes álcoois (Brun et al., 2008; You et al., 2014). Os polímeros biodegradáveis à base de ácido hialurônico têm sido utilizados com êxito nos processos de reparação óssea e nas células estaminais mesenquimais em estudos *in vitro* e *in vivo* (Gardin et al., 2011; Brun et al., 1999; Zavan et al., 2005) e em aplicações clínicas (Brun et al., 2008; You et al., 2014).

O hialuronano é uma molécula do tecido conjuntivo e tem papel fundamental em muitos processos biológicos, tais como no equilíbrio de água, no reconhecimento de células embrionárias, desenvolvimento e cicatrização de feridas (Prescott et al.,

2008). O ácido hialurônico tem funções estruturais e fisiológicas dentro dos tecidos, incluindo a interação de fator de crescimento, regulação da pressão osmótica e lubrificação do tecido, o que ajuda a manter a integridade estrutural e homeostática (Gocmen et al., 2015)

Além disso, o ácido hialurônico é rapidamente convertido no corpo em hialuronidase, com meia-vida nos tecidos variando de horas a dias (Vindigni et al., 2009). Experiências *in vivo* sugerem que o hialuronano sozinho ou em combinação com outros biomateriais poderia proporcionar um ambiente adequado para a indução e formação de dentina reparadora através das células estaminais mesenquimais diferenciadas (Sasaki, Kawamata-Kido, 1995; Kuo et al., 2008; Inuyama et al., 2010; Bogovic et al., 2011).

O ácido hialurônico (AH) pode ser empregado em scaffold devido à sua ação na funcionalidade da matriz extracelular. Produzido também pelos fibroblastos, o AH contribui significativamente na hidrodinâmica tecidual, na migração celular e na sua proliferação (Bansal et al., 2010). Em um estudo de Takeda et al. (2011) observaram que scaffolds de ácido hialurônico empregados em dentes de cachorros, foram promotores da adesão e proliferação de fibroblastos do ligamento periodontal. Assim, devido a estas propriedades, o uso do ácido hialurônico pode ser uma alternativa para o tratamento da superfície radicular antes do reimplante.

Imediatamente após o reimplante de um dente que sofreu avulsão, uma resposta inflamatória ocorre como parte da cura do periodonto e são liberadas citocinas inflamatórias nesta região. Estas citocinas correspondem à uma família de peptídeos, que são pequenas sequências de aminoácidos capazes de interagir com receptores específicos das membranas celulares (Consolaro, 2009). Influenciam a atividade, diferenciação, proliferação e sobrevivência da célula, assim como atenuam ou aumentam a resposta inflamatória (Oliveira et al., 2011).

A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina com atuação tanto na resposta imune inata como na adaptativa (Gomes et al., 2009). É um importante marcador inflamatório, e está envolvida em uma série de atividades imunológicas, em especial a síntese de substâncias de fase aguda pelo fígado (Garcia et al., 2002; Gomes et al., 2009). Também é um importante mediador da febre. Mantém a homeostase tecidual,

e é capaz de mediar a resposta aguda, além de ser um fator de crescimento hematopoiético, induz a diferenciação neuronal das células e contribui com a remodelação óssea (Lyngstadaas et al., 2001). A IL-6 regula as respostas imunes em locais da inflamação e possui atividade autocrina / paracrina estimulando a formação de osteoclastos e a atividade de reabsorção óssea de osteoclastos pré-formados (Okada et al., 1997; Kurihara et al., 1990).

Já a interleucina 8 (IL-8) é uma citocina pró-inflamatória que participa da defesa do hospedeiro, bem como em vários graus de danos ao tecido, sendo muito importante na resposta inflamatória devido à sua ação quimiotática para neutrófilos, mediando a resposta inflamatória, e atuando como fator angiogênico. (Nasser et al., 2009; Baek et al., 2013; Cvikl et al., 2015). É produzida principalmente por queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais e macrófagos em resposta às bactérias periodontais e componentes bacterianos. Atua direcionando neutrófilos polimorfonucleares para o local da infecção, o que resulta na produção de mais citocinas, contribuindo para a progressão da doença (Sahingur, Yeudall, 2015).

O agrupamento de genes da interleucina-1 (IL1) está localizado no cromossomo 2 humano e contém genes que codificam citocinas pró-inflamatórias que incluem IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , bem como o antagonista anti-inflamatório do receptor de IL-1 da citocina (IL-1RA). Embora a IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  sejam produtos de genes distintos, eles reconhecem os mesmos receptores da superfície celular e compartilham um amplo espectro de atividades biológicas que regulam as funções da resposta imune inata e adaptativa (Dinarello, 1991).

A IL-1 $\beta$  é conhecida por ser uma das citocinas pró-inflamatórias relacionadas à reabsorção óssea osteoclástica (Lang et al., 2000; Bastos et al., 2017). É especialmente importante porque é liberada principalmente por monócitos ativados e participa da resposta da fase aguda na indução da reabsorção óssea. IL-1 $\beta$  também é considerada um poderoso indutor da produção de IL-6 (Uematsu et al., 1996). É expressa pelos fibroblastos do ligamento periodontal, e capaz de mediar o processo de defesa do hospedeiro, como por exemplo, a resposta inflamatória e celular a uma injúria (Lin et al., 2015). Exacerba a resposta inflamatória e promove a progressão para estágios mais avançados da doença, assim como causa a perda da rede de fibra de colágeno em torno do infiltrado inflamatório devido à ativação do sistema imune

local. Na presença da IL-1 $\beta$ , as células do ligamento periodontal são capazes de mudar suas características fenotípicas de forma transitória e passam a mediar processos catabólicos como a reabsorção óssea (Kanzaki et al., 2002).

O fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) refere-se a um grupo de citocinas capaz de provocar a morte de células (apoptose) e que possuem uma vasta gama de ações pró-inflamatórias. O TNF- $\alpha$  é secretado principalmente por macrófagos e possui em sua família o fator de necrose tumoral alfa e beta (TNF $\alpha$  e TNF $\beta$ ) que também promovem reabsorção óssea atuando principalmente na osteoclastogênese, sendo capaz de, coordenadamente, estimular a indução de IL-1 $\beta$  e diminuir os efeitos da mesma (Lin et al., 2015). Responsável pela hiperalgesia inflamatória e neuropática, estimula a proliferação de linfócitos-T e fibroblastos.

Por isso, o processo inflamatório que acontece após o reimplante de dentes previamente tratados tem gerado questionamentos, a cerca de quais mediadores químicos inflamatórios são liberados e qual o papel dos mesmos na resposta inflamatória.

O processo de cura dos tecidos ao redor de um dente reimplantado tardiamente pode ser avaliado através da análise histomorfométrica e imunohistoquímica, que se complementam na busca pela informação precisa de expressão e localização de cada proteína envolvida na cura do ligamento periodontal (Saito et al., 2011; Carvalho et al., 2012).

Para avaliar a viabilidade das células que se aderem a superfície radicular após reimplante de dentes submetidos a diferentes tratamentos de superfície e avaliar a adesão desta célula à superfície radicular, utilizam-se testes de sobrevivência e viabilidade celular e análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV), respectivamente (Mori et al., 2007; Palaiologou et al., 2001).

Sendo assim, este estudo pretende avaliar a eficácia do tratamento da superfície radicular de dentes avulsionados com EDTA 17% por 5 min concomitante ao uso do ácido hialurônico nos diferentes períodos de ressecamento propostos, quanto a viabilidade de fibroblastos da superfície radicular através de teste de XTT; a quantificação das citocinas IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  pelo ensaio ELISA e em caráter ilustrativo a adesão de fibroblastos na superfície radicular por MEV. A hipótese do

estudo é a de que o tratamento da superfície radicular com EDTA 17% por 5 min concomitante ao uso do ácido hialurônico aumentem a viabilidade celular dos fibroblastos do ligamento periodontal, permitindo a regeneração dos mesmos.

## 7 CONCLUSÃO

Pode se concluir que:

- o ácido hialurônico associado ao EDTA 17% aumenta a viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal quando o cimento é mantido íntegro em dentes com até 24h de ressecamento da superfície radicular;
- não houve modificações significativas na expressão das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  quando a superfície radicular foi ressecada por até 24h e tratada com EDTA 17% e ácido hialurônico;
- ocorreu adesão de PDLFs na superfície radicular dos dentes com até 24 h de ressecamento;
- o tratamento da superfície radicular com EDTA 17% por 5 min e ácido hialurônico pode ser uma proposta para tratamento de dentes submetidos a reimplante tardio.

## REFERÊNCIAS\*

Adams ME, Atkinson MH, Lussier AJ, Schulz JI, Siminovitch KA, Wade JP et al. The role of viscosupplementation with hylan G-F 20 (Synvisc) in the treatment of osteoarthritis of the knee: a Canadian multicenter trial comparing hylan G-F 20 alone, hylan G-F 20 with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and NSAIDs alone. *Osteoarthritis Cartilage*.1995;3(4):213–25.

Ahn HJ, Nam OH, Lee HS, Kim EC, Cohenca N, Choi SC. Expression of inflammatory cytokines and MMPs on replanted teeth at different extra-alveolar time: an ex vivo and in vivo study. *Int J Paediatr Dent*. 2016 Jul;26(4):301-9. doi: 10.1111/ipd.12211.

Andreasen JO, Hjorting-Hansen E. Replantation of teeth. I. Radiographic and clinical study of 110 human teeth replanted after accidental loss. *Acta Odontol Scand*. 1966 Nov;24(3):263–86.

Andreasen JO. The effect of extra-alveolar period and storage media upon periodontal and pulpal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Int J Oral Surg*.1981 Feb;10(1):43–53. doi: 10.1016/S0300-9785(81)80007-5.

Baek KJ, Choi Y, Ji S. Gingival fibroblasts from periodontitis patients exhibit inflammatory characteristics in vitro. *Arch Oral Biol*. 2013 Oct;58(10):1282-92. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.07.007.

Bai J, Qin M, Zhao YM, Huang MW, Ji AP. Chemical removal of necrotic periodontal ligament on delayed replanted teeth by sodiumhypochlorite: morphological analysis and microhardness indentation test of cementum. *Int Endod J*. 2016 Apr;49(4):393-401. doi: 10.1111/iej.12467.

Bansal J, Kedige SD, Anand S. Hyaluronic acid: a promising mediator for periodontal regeneration. *Indian J Dent Res*. 2010 Oct-Dec;21(4):575-8. doi: 10.4103/0970-9290.74232.

Barbizam JV, Massarwa R, da Silva LA, da Silva RA, Nelson-Filho P, Consolaro A, et al. Histopathological evaluation of the effects of variable extraoral dry times and enamel matrix proteins (enamel matrix derivatives) application on replanted dogs' teeth. *Dent Traumatol*. 2015 Feb;31(1):29-34. doi: 10.1111/edt.12131.

Bartold PM, Wiebkin OW, Thonard JC. Glycosaminoglycans of human gingival epithelium and connective tissue. *Connect Tissue Res*.1981;9(2):99–106.

\* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jan 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Bastone EB, Freer TJ, McNamara JR. Epidemiology of dental trauma: a review of the literature. *Aust Dent J*. 2000 Mar;45(1):2–9.

Bastos JV, Silva TA, Colosimo EA, Côrtes MI, Ferreira DA, Goulart EM, et al. Expression of inflammatory cytokines and chemokines in replanted permanent teeth with external root resorption. *J Endod*. 2017 Feb;43(2):203-9. doi: 10.1016/j.joen.2016.10.018.

Belibasakis GN, Thurnheer T, Bostanci N. Interleukin-8 responses of multi-layer gingival epithelia to subgingival biofilms: role of the “red complex” species. *PLoS One*. 2013 Dec 10;8(12):e81581. doi: 10.1371/journal.pone.0081581.

Belsky E, Toole BP. Hyaluronate and hyaluronidase in the developing chick embryo kidney. *Cell Differ*. 1983;12(2):61–6.

Bin CV, Valera MC, Camargo SE, Rabelo SB, Silva GO, Balducci I, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2012 Apr;38(4):495-500. doi: 10.1016/j.joen.2011.11.003.

Bogović A, Nižetić J, Galić N, Zelježić D, Micek V, Mladinić M. The effects of hyaluronic acid, calcium hydroxide and dentin adhesive on rat odontoblasts and fibroblasts. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2011 Jun; 62(2):155–61. doi: 10.2478/10004-1254-62-2011-2076.

Bohl KS, Shon J, Rutherford B, Mooney DJ. Role of synthetic extracellular matrix in development of engineered dental pulp. *J Biomater Sci Polym Ed*. 1998;9(7):749–64.

Bolortuya G, Ebihara A, Ichinose S, Watanabe S, Anjo T, Kokuzawa C, et al. Effects of dentin surface modifications treated with Er:YAG and Nd:YAG laser irradiation on fibroblast cell adhesion. *Photomed Laser Surg*. 2012 Feb;30(2):63-70. doi: 10.1089/pho.2011.3132.

Blomlöf L, Bergman E, Forsgårdh A, Foss L, Larsson A, Sjöberg B, et al. A clinical study of root surface conditioning with an EDTA gel. I. Nonsurgical periodontal treatment. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2000 Dec;20(6):560-5.

Brackett MG, Messer RL, Lockwood PE, Bryan TE, Lewis JB, Bouillaguet S, et al. Cytotoxic response of three cell lines exposed in vitro to dental endodontic sealers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010 Nov;95(2):380-6. doi: 10.1002/jbm.b.31727.

Brun P, Cortivo R, Zavan B, Vecchiato N, Abatangelo G. In vitro reconstructed tissues on hyaluronan-based temporary scaffolding. *J Mater Sci Mater Med*. 1999 Oct-Nov;10(10/11):683-8.

Brun P, Dickinson SC, Zavan B, Cortivo R, Hollander AP, Abatangelo G. Characteristics of repair tissue in second-look and third-look biopsies from patients treated with engineered cartilage: relationship to symptomatology and time after implantation. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(6):132. doi: 10.1186/ar2549.

Çalt S, Serper A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. *J Endod*. 2002



Jan;28(1):17-9.

Camargo CH, Oliveira TR, Silva GO, Rabelo SB, Valera MC, Cavalcanti BN. Setting time affects in vitro biological properties of root canal sealers. *J Endod.* 2014 Apr;40(4):530-3. doi: 10.1016/j.joen.2013.08.009.

Carvalho Edos S, Costa FT, Campos MS, Anbinder AL, Neves AC, Habitante SM, et al. Root surface treatment using diode laser in delayed tooth replantation: radiographic and histomorphometric analyses in rats. *Dent Traumatol.* 2012 Dec;28(6):429-36. doi: 10.1111/j.1600-9657.2011.01108.x.

Chen WY, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair Regen.* 1999;7(2):79-89.

Ciapetti G; Granchi D; Verri E; Savarino L; Cavedagna D; Pizzoferrato A. Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. *Biomaterials.* 1996 Jul;17(13):1259-64.

Consolaro. Inflamação e reparo: um sílabo para a compreensão clínica e implicações terapêuticas. Maringá; Dental Press, 2009.

Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun.* 1991 Jul;3(7):207-12.

Cruz AS; Cuppoloni KM; Martinez CHO; Gomes LFS. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* 1987;47(1): 51-57.

Cvek M, Cleaton-Jones P, Austin J, Lownie J, Kling M, Fatti P. Effect of topical application of doxycycline on pulp revascularization and periodontal healing in reimplanted monkey incisors. *Endod Dent Traumatol.* 1990 Aug;6(4):170-6.

Cvikl B, Lussi A, Moritz A, Sculean A, Gruber R. Sterile-filtered saliva is a strong inducer of IL-6 and IL-8 in oral fibroblasts. *Clin Oral Investig.* 2015 Mar;19(2):385-99. doi: 10.1007/s00784-014-1232-3.

Diomedede F, Caputi S, Merciaro I, Frisone S, D'Arcangelo C, Piattelli A, et al. Proinflammatory cytokine release and cell growth inhibition in primary human oral cells after exposure to endodontic sealer. *Int Endod J.* 2014 Sep;47(9):864-72. doi: 10.1111/iej.12230.

Dinarello CA. Inflammatory cytokines: interleukin-1 and tumor necrosis factor as effector molecules in autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol.* 1991 Dec;3(6):941-8.

Dos Santos CL, Sonoda CK, Poi WR, Panzarini SR, Sundefeld ML, Negri MR. Delayed replantation of rat teeth after use of reconstituted powdered milk as a storage medium. *Dent Traumatol*. 2009 Feb;25(1):51-7. doi: 10.1111/j.1600-9657.2008.00723.x.

Duggal MS, Toumba KJ, Russell JL, Paterson SA. Replantation of avulsed permanent teeth with avital periodontal ligaments: case report. *Endod Dent Traumatol*. 1994 Dec;10(6):282-5.

Esper HR, Panzarini SR, Poi WR, Sonoda CK, Casatti CA. Mechanical removal of necrotic periodontal ligament by either Robinson bristle brush with pumice or scalpel blade. Histomorphometric analysis and scanning electron microscopy. *Dent Traumatol*. 2007 Dec;23(6):333-9. doi:10.1111/j.1600-9657.2006.00472.x.

Fawzy El-Sayed KM, Dahaba MA, Aboul-Ela S, Darhous MS. Local application of hyaluronan gel in conjunction with periodontal surgery: a randomized controlled trial. *Clin Oral Investig*. 2012 Aug;16(4):1229-36. doi: 10.1007/s00784-011-0630-z.

Flores MT, Andreasen JO, Bakland LK, Feiglin B, Gutmann JL, Oikarinen K, et al. International Association of Dental Traumatology. Guidelines for the evaluation and management of traumatic dental injuries. *Dent Traumatol*. 2001 Oct;17(5):193-8.

Fraser JR, Laurent TC. Turnover and metabolism of hyaluronan. *Ciba Found Symp* 1989;143:41-53; discussion 53-9, 281-5.

Galler KM, D'Souza RN, Hartgerink JD, Schmalz G. Scaffolds for dental pulp tissue engineering. *Adv Dent Res*. 2011 Jul;23(3): 333-9. doi: 10.1177/0022034511405326.

Garcia JBS, Issy AM, Sakata RK. Citocinas e anestesia. *Rev Bras Anesthesiol*. 2002;52(1):86-100.

Gardin C, Vindigni V, Bressan E, Ferroni L, Nalesso E, Puppa AD, et al. Hyaluronan and fibrin biomaterial as scaffolds for neuronal differentiation of adult stem cells derived from adipose tissue and skin. *Int J Mol Sci*. 2011;12(10):6749-64. doi: 10.3390/ijms12106749.

Gerdin B, Hallgren R. Dynamic role of hyaluronan (HYA) in connective tissue activation and inflammation. *J Intern Med*. 1997;242(1):49-55.

Giannobile WV, Riviere GR, Gorski JP, Tira DE, Cobb CM. Glycosaminoglycans and periodontal disease: analysis of GCF by safranin O. *J Periodontol* 1993;64(3):186-90.

Gocmen G, Gonul O, Oktay NS, Yarat A, Goker K. The antioxidant and anti-inflammatory efficiency of hyaluronic acid after third molar extraction. *J Craniomaxillofac Surg*. 2015 Sep;43(7):1033-7. doi: 10.1016/j.jcms.2015.04.022.

Gomes MAM, Neto NCM, Bispo IGA. Interleucina-6, moléculas de adesão intercelular-

1 e microalbuminúria na avaliação da lesão endotelial: Revisão de Literatura. *Rev Soc cardiol do Rio de Janeiro*. 2009;22:398-403.

Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2008 Aug;79(8 Suppl):1585–91. doi: 10.1902/jop.2008.080183.

Guess WL, Rosenbluth SA, Schimidt B, Autian JJ. *Pharm Sci*.1965; 54(10):1545-7.

Guzmán-Martínez N, Silva-Herzog FD, Méndez GV, Martín-Pérez S, Cerda-Cristerna BI, Cohenca N. The effect of Emdogain and 24% EDTA root conditioning on periodontal healing of replanted dog's teeth. *Dent Traumatol*. 2009 Feb;25(1):43-50. doi: 10.1111/j.1600-9657.2008.00741.x.

Hakki SS, Korkusuz P, Berk G, Dundar N, Saglam M, Bozkurt B, et al. Comparison of Er,Cr:YSGG laser and hand instrumentation on the attachment of periodontal ligament fibroblasts to periodontally diseased root surfaces: an in vitro study. *J Periodontol*. 2010 Aug;81(8):1216-25. doi: 10.1902/jop.2010.090715.

Hu X, Peng Y, Sum CP, Ling J. Effects of concentrations and exposure times of sodium hypochlorite on dentin deproteination: attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy study. *J Endod*. 2010 Dec;36(12):2008-11. doi: 10.1016/j.joen.2010.08.035.

Huang GT, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, et al. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A*. 2010 Feb;16(2):605–15. doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0518.

Huang X, Zhang J, Huang C, Wang Y, Pei D. Effect of intracanal dentine wettability on human dental pulp cell attachment. *Int Endod J*. 2012 Apr;45(4):346-53. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01982.x.

Huskisson EC, Donnelly S. Hyaluronic acid in the treatment of osteoarthritis of the knee. *Rheumatology (Oxford)*. 1999;38(7):602-7.

Inuyama Y, Kitamura C, Nishihara T, Morotomi T, Nagayoshi M, Tabata Y, et al. Effects of hyaluronic acid sponge as a scaffold on odontoblastic cell line and amputated dental pulp. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010 Jan;92(1):120-8. doi: 10.1002/jbm.b.31497.

Iwata H, Urist MR. Hyaluronic acid production and removal during bone morphogenesis in implants of bone matrix in rats. *Clin Orthop. Relat Res*. 1973;(90):236-45.

Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol Rev*. 2011;Jan;91(1):221-64. doi: 10.1152/physrev.00052.2009.

Johannsen A, Tellefsen M, Wikesjö U, Johannsen G. Local delivery of hyaluronan as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2009 Sep;80(9):1493-7. doi: 10.1902/jop.2009.090128.

Kanno CM, Saad-Neto M, Oliveira JA, Escobar CAB, Saito CTMH. The effects of one per cent sodium hypochlorite solution upon the periodontal ligament of the rat incisors. *Arq Odontol.* 2001;37(1):35-43.

Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J Bone Miner Res.* 2002 Feb;17(2):210-20.

Ke Y, Wang YJ, Ren L, Zhao QC, Huang W. Modified PHBV scaffolds by in situ UV polymerization: structural characteristic mechanical properties and bone mesenchymal stem cell compatibility. *Acta Biomater.* 2010 Apr;6(4):1329-36. doi: 10.1016/j.actbio.2009.10.026.

Kenny DJ, Barrett EJ, Johnson DH, Sigal MJ, Tenenbaum HC. Clinical management of avulsed permanent incisors using Emdogain: initial report of an investigation. *J Can Dent Assoc.* 2000 Jun;66(1):21-9.

Kim SY, Yang SE. Surgical repair of external inflammatory root resorption with resin-modified glass ionomer cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011 Apr;111(4):e33-6. doi: 10.1016/j.tripleo.2010.12.004.

Kim DJ, Cha JK, Yang C, Cho A, Lee JS, Jung UW, et al. Changes in periodontium after extraction of a periodontally-involved tooth in rats. *J Periodontal Implant Sci.* 2012 Oct;42(5):158-65. doi: 10.5051/jpis.2012.42.5.158.

Kuo TF, Huang AT, Chang HH, Lin FH, Chen ST, Chen RS, et al. Regeneration of dentin-pulp complex with cementum and periodontal ligament formation using dental bud cells in gelatin-chondroitin hyaluronan tri-copolymer scaffold in swine. *J Biomed Mater Res A.* 2008 Sep;86(4):1062-8. doi: 10.1002/jbm.a.31746.

Kurihara N, Bertolini D, Suda T, Akiyama Y, Roodman GD. IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J Immunol.* 1990;144(11):4226-30.

Lang NP, Tonetti MS, Suter J, Sorrell J, Duff GW, Kornman KS. Effect of interleukin-1 gene polymorphisms on gingival inflammation assessed by bleeding on probing in a periodontal maintenance population. *J Periodontal Res.* 2000;35(2):102-7.

Liguori V, Guillemin C, Pesce GF, Mirimanoff RO, Bernier J. Double-blind, randomized clinical study comparing hyaluronic acid cream to placebo in patients treated with radiotherapy. *Radiother Oncol.* 1997;42(2):155-61. doi:S0167-8140(96)01882-8.

Liu J, Tang X, Li C, Pan C, Li Q, Geng F, et al. *Porphyromonas gingivalis* promotes the cell cycle and inflammatory cytokine production in periodontal ligament fibroblasts. *Arch Oral Biol.* 2015 Aug;60(8):1153-61. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.05.004.

Lin X, Kong J, Wu Q, Yang Y, Ji P. Effect of TLR4/MyD88 signaling pathway on expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in synovial fibroblasts from temporomandibular joint

exposed to lipopolysaccharide. *Mediators Inflamm.* 2015;2015: 329405. doi: 10.1155/2015/329405.

Longo DL, Fumes AC, Küchler EC, Paula-Silva FWG, Filho PN, Silva LAB. Efficiency of diferente storage media for avulsed teeth in animal models: a systematic review. *Dent Traumatol.* 2017 Aug 29. doi: 10.1111/edt.12365.

Lopes HP, Siqueira Jr JF. *Endodontia: biologia e técnica.* 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.

Lustosa-Pereira A, Garcia RB, de Moraes IG, Bernardineli N, Bramante CM, Bortoluzzi EA. Evaluation of the topical effect of alendronate on the root surface of extracted and replanted teeth. Microscopic analysis on rats' teeth. *Dent Traumatol* 2006 Set;22(1):30–5. doi:10.1111/j.1600-9657.2006.00417.x.

Lyngstadaas SP, Lundberg E, Ekdahl H, Andersson C, Gestrelus S. Autocrine growth factors in human periodontal ligament cells cultured on enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol.* 2001 Feb;28(2):181-8.

Marinho ACS, Martinho FC, Leite FRM, Nascimento GG, Gomes BPF. Proinflammatory activity of primarily infected endodontic content against macrophages after different phases of root canal therapy. *J Endod.* 2015 Jun;41(6):817-23. doi: 10.1016/j.joen.2015.01.017.

Martinho FC, Camargo SEA, Fernandes AMM, Campos MS, Prado RF, Camargo CHR, et al. Comparison of cytotoxicity, genotoxicity and immunological inflammatory biomarker activity of several endodontic sealers against immortalized human pulp cells. *Int Endod J.* 2018;51(1):41-57. doi: 10.1111/iej.12785.

Matsuno H, Yudoh K, Kondo M, Goto M, Kimura T. Biochemical effect of intra-articular injections of high molecular weight hyaluronate in rheumatoid arthritis patients. *Inflamm Res.* 1999;48(3):154-9.

McDonald N, Strassler HE. Evaluation for tooth stabilization and treatment of traumatized teeth. *Dent Clin North Am.* 1999 Jan;43(1):135-49, vii.

Mooney DJ, Powell C, Piana J, Rutherford B. Engineering dental pulp-like tissue in vitro. *Biotechnol Prog.* 1996 Nov-Dec;12(6):865-8. doi: 10.1021/bp960073f.

Mori GC, de Moraes IG, Garcia RB, Borro LC, Purificação BR. Microscopic investigation of gallium nitrate for root surface treatment in rat teeth submitted to delayed replantation. *Braz Dent J.* 2007;18(3):198-201.

Mori GG, Poi WR, Castilho LR. Evaluation of the anti-resorptive ability of an experimental acetazolamide paste for the treatment of late replanted teeth: a study in rats. *Dent Traumatol.* 2013 Fev;29(1):34-40. doi: 10.1111/j.1600-9657.2012.01131.x.

Moreira CS. Influência de diferentes tratamentos físico-químicos na adesão e viabilidade de fibroblastos de ligamento periodontal à superfície radicular simulando

dentes avulsionados. [Tese]. São José dos Campos (São Paulo): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP- Univ Estadual Paulista; 2016.

Nasser MW, Raghuwanshi SK, Grant DJ, Jala VR, Rajarathnam K, Richardson RM. Differential activation and regulation of CXCR1 and CXCR2 by CXCL872 monomer and dimer. *J Immunol.* 2009 Sep 1;183(5):3425-32. doi: 10.4049/jimmunol.0900305.

Nyman S., Houston F., Sarhed G., Lindhe J., Karring T. Healing following reimplantation of teeth subjected to root planing and citric acid treatment. *J Clin Periodontol* 1985 Abr;12(4):294–305.

Nör J, Peters MC, Christensen JB, Sutorik MM, Linn S, Khan MK, et al. Engineering and characterization of functional human microvessels in immunodeficient mice. *Lab Invest.* 2001;81(4):453-63.

Okada N, Kobayashi M, Mugikura K. Interleukin-6 production in human fibroblasts derived from periodontal tissues is differentially regulated by cytokines and a glucocorticoid. *J Periodontal Res.* 1997;32(7):559-69.

Oksala O, Salo T, Tammi R, Hakkinen L, Jalkanen M, Inki P, et al. Expression of proteoglycans and hyaluronan during wound healing. *J Histochem Cytochem.* 1995;43(2):125-35.

Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Citocinas e Dor. *Rev Bras Anesthesiol.* 2011;61(2):255-65.

Oliveira GJPL, Theodoro LH, Marcantonio Junior E, Sampaio JEC, Marcantonio RAC. Effect of Er,Cr:YSGG and Er:YAG laser irradiation on the adhesion of blood components and on root morphology. *Braz Oral Res.* 2012 May-Jun;26(3):256-62.

Palaiologou AA, Yukna RA, Moses R, Lallier TE. Gingival, dermal, and periodontal ligament fibroblasts express different extracellular matrix receptors. *J Periodontol.* 2001 Jun;72(6):798-807. doi: 10.1902/jop.2001.72.6.798.

Pang NS, Lee SJ, Kim E, Shin DM, Cho SW, Park W, et al. Effect of EDTA on attachment and differentiation of dental pulp stem cells. *J Endod.* 2014 Jun;40(6):811-7. doi: 10.1016/j.joen.2013.09.007.

Panzarini SR, Carvalho ACP, Poi WR, Sonoda CK. Use of vitamin C in delayed tooth replantation. *Braz Dent J.* 2005;16(1):17-22. doi:/S0103-64402005000100003.

Panzarini SR, Gulinelli JL, Poi WR, Sonoda CK, Pedrini D, Brandini DA. Treatment of root surface in delayed tooth replantation: a review of literature. *Dent Traumatol.* 2008 Jun;24(3):277-82. doi: 10.1111/j.1600-9657.2008.00555.x.

Panzarini SR. Effect of the treatment of root surface-adhered necrotic periodontal ligament with propolis or fluoride in delayed rat tooth replantation. *Clin Oral Investig.* 2014 Mai;18(4):1329-33. doi: 10.1007/s00784-013-1103-3.

Prasad SS, Radharani C, Varma S, Kumar SV, Sinha S, Bijle MN. Effects of citric acid and EDTA on periodontally involved root surfaces: a SEM study. *J Contemp Dent Pract.* 2012 Jul 1;13(4):446-51.

Prescott RS, Alsanea R, Fayad MI, Johnson BR, Wenckus CS, Hao J, et al. In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *J Endod.* 2008 Apr;34(4):421-6. doi: 10.1016/j.joen.2008.02.005.

Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2011 Mar;38 Suppl 11:60-84. doi: 10.1111/j.1600051X.2010.01671.x.

Rajan P, Baramappa R, Rao NM, Pavaluri AK, P I, Rahaman SM. Hyaluronic Acid as an adjunct to scaling and root planing in chronic periodontitis. A randomized clinical trail. *J Clin Diagn Res.* 2014 Dec;8(12):ZC11-4. doi: 10.7860/JCDR/2014/8848.5237.

Roberts-Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol.* 2000 Nov;45(11):1013-6.

Rogero SO; Higa OZ; Saiki M; Correa OV; Costa I. Cytotoxicity due to corrosion of ear piercing studs. *Toxicol In Vitro.* 2000 Dec;14(6):497-504.

Rogero SO, Malmonge SM, Lugão AB, Ikeda TI, Miyamaru L, Cruz AS. Biocompatibility study of polymeric biomaterials. *Artif Organs.* 2003 May;27(5):424-7.

Sahingur SE, Yeudall WA. Chemokine function in periodontal disease and oral cavity cancer. *Front Immunol.* 2015 May;6:214. doi: 10.3389/fimmu.2015.00214.

Saito CTMH, 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 Feb;27(1):30-9. doi: 10.1111/j.1600-9657.2010.00946.x.

Saminathan A, Vinoth KJ, Low HH, Cao T, Meikle MC. Engineering three-dimensional constructs of the periodontal ligament in hyaluronan–gelatin hydrogel films and a mechanically active environment. *J Periodont Res.* 2013 Dec;48(6):790-801. doi: 10.1111/jre.12072.

Sasaki T, Kawamata-Kido H. Providing an environment for reparative dentine induction in amputated rat molar pulp by high molecular-weight hyaluronic acid. *Arch Oral Biol.* 1995 Mar;40(3):209-19.

Scelza MZ, Linhares AB, da Silva LE, Granjeiro JM, Alves GG. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. *Int Endod J.* 2012 Jan;45(1):12-8. doi: 10.1111/j.13652591.2011.01941.x.

Schwarze T, Leyhausen G, Geurtsen W. Long-term cytocompatibility of various endodontic sealers using a new root canal model. *J Endod*. 2002 Nov;28(11):749-53. doi:10.1097/00004770-200211000-00001.

Selvig KA, Bjorvatn K, Claffey N. Effect of stannous fluoride and tetracycline on repair after delayed replantation of root-planed teeth in dogs. *Acta Odontol Scand*. 1990 Apr;48(2):107-12.

Selvig KA, Bjorvatn K, Bogle GC, Wikesjo UM. Effect of stannous fluoride and tetracycline on periodontal repair after delayed tooth replantation in dogs. *Scand J Dent Res*. 1992 Jul;100(4):200-3.

Shibata M, Shintaku Y, Matsuzaki K, Uematsu S. The effect of IL-17 on the production of proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinase-1 by human periodontal ligament fibroblasts. *Orthod Craniofac Res*. 2014 Feb;17(1):60-8. doi: 10.1111/ocr.12033.

Sigalas E, Regan JD, Kramer PR, Witherspoon DE, Opperman LA. Survival of human periodontal ligament cells in media proposed for transport of avulsed teeth. *Dent Traumatol*. 2004 Feb;20(1):21-8.

Silva GO, Cavalcanti BN, Oliveira TR, Bin CV, Camargo SE, Camargo CH. Cytotoxicity and genotoxicity of natural resin-based experimental endodontic sealers. *Clin Oral Investig*. 2016 May;20(4):815-9. doi: 10.1007/s00784-015-1567-4.

Söder PO, Otteskog P, Andreassen JO, Modéer T. Effect of drying on viability of periodontal membrane. *Scand J Dent Res*. 1977 Mar;85(3):164-8.

Sonoda CK, Poi WR, Panzarini SR, Sottovia AD, Okamoto T. Tooth replantation after keeping the avulsed tooth in oral environment: case report of a 3-year follow-up. *Dent Traumatol*. 2008 Jun;24(3):373-6. doi: 10.1111/j.1600-9657.2007.00522.x.

Sottovia AD, Sonoda CK, Poi WR, Panzarini SR, Lauris JR. Delayed tooth replantation after root surface treatment with sodium hypochlorite and sodium fluoride: histomorphometric analysis in rats. *J Appl Oral Sci*. 2006 Apr;14(2):93-9.

Srisuwan T, Tilkorn DJ, Al-Benna S, Abberton K, Messer HH, Thompson EW. Revascularization and tissue regeneration of an empty root canal space is enhanced by a direct blood supply and stem cells. *Dent Traumatol*. 2013 Apr;29(2):84-91. doi: 10.1111/j.1600-9657.2012.01136.x.

Takeda K, Sakai N, Shiba H, Nagahara T, Fujita T, Kajiya M, et al. Characteristics of high-molecular-weight hyaluronic acid as a brain-derived neutrophilic factor scaffold in periodontal tissue regeneration. *Tissue Eng Part A*. 2011 Apr;17(78):955-67. doi: 10.1089/ten.TEA.2010.0070.

Tartari T, Bachmann L, Maliza AG, Andrade FB, Duarte MA, Bramante CM. Tissue dissolution and modifications in dentin composition by different sodium hypochlorite



concentrations. *J Appl Oral Sci.* 2016 May-Jun;24(3):291-8. doi: 10.1590/1678-775720150524.

Tartari T, Bachmann L, Zancan RF, Vivian RR, Duarte MA, Bramante CM. Analysis of the effects of several decalcifying agents alone and in combination with sodium hypochlorite on the chemical composition of dentine. *Int Endod J.* 2017 Mar 17. doi: 10.1111/iej.12764.

Toole BP, Gross J. The extracellular matrix of the regenerating newt limb: synthesis and removal of hyaluronate prior to differentiation. *Dev Biol.* 1971;25(1):57-77.

Toole BP, Jackson G, Gross J. Hyaluronate in morphogenesis: inhibition of chondrogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972;69(6):1384-6.

Trevino EG, Patwardhan AN, Henry MA, Perry G, Dybdal-Hargreaves N, Hargreaves KM, et al. Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. *J Endod.* 2011 Aug;37(8):1109-15. doi: 10.1016/j.joen.2011.05.013.

Trope M. Root resorption of dental and traumatic origin: classification based on etiology. *Pract Periodontics Aesthet Dent.* 1998 May;10(4):515-22.

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

Trope M. Avulsion of permanent teeth: theory to practice. *Dental Traumatol.* 2011 Aug;27(4):281-94; doi: 10.1111/j.1600-9657.2011.01003.x.

Uematsu S, Mogi M, Deguchi T. Interleukin (IL)-1 beta, IL-6, tumor necrosis factor-alpha, epidermal growth factor, and beta 2-microglobulin levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 1996;75(1):562-7. doi:10.1177/00220345960750010801.

Vindigni V, Cortivo R, Iacobellis L, Abatangelo G, Zavan B. Hyaluronan benzyl ester as a scaffold for tissue engineering. *Int J Mol Sci.* 2009 Jul 3;10(7):2972-85. doi: 10.3390/ijms10072972.

Waddington RJ, Embery G. Proteoglycans and orthodontic tooth movement. *J Orthod.* 2001 Dec;28(4):281-90. doi:10.1093/ortho/28.4.281.

Wang Y, Cheung GS, Xu X, Zhao S, Zhang C. The effect of cultured autologous periodontal ligament cells on the healing of delayed autotransplanted dog's teeth. *J Endod.* 2010 Feb;36(2):264-7. doi: 10.1016/j.joen.2009.09.014.

Weigel PH, Fuller GM, LeBoeuf RD. A model for the role of hyaluronic acid and fibrin in the early events during the inflammatory response and wound healing. *J Theor Biol.* 1986;119(2):219-34.

Wu JJ, Shih LY, Hsu HC, Chen TH. The double-blind test of sodium hyaluronate (ARTZ) on osteoarthritis knee. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 1997;59(2):99-106.

Wu X, Zhang G, Wang X, Zhang P, Tan Y. Endotoxin tolerance induction in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with different bacterial lipopolysaccharides. *Arch Oral Biol.* 2015;60(3):463-70. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.10.005.

Yang X, Han G, Pang X, Fan M. Chitosan/collagen scaffold containing bone morphogenetic protein-7 DNA supports dental pulp stem cell differentiation in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res Part A.* 2012 Feb 18. doi: 10.1002/jbm.a.34064.

You HJ, Han SK, Rhie JW. Randomised controlled clinical trial for autologous fibroblast-hyaluronic acid complex in treating diabetic foot ulcers. *J Wound Care.* 2014 Nov;23(11):521-2, 524, 526-30. doi: 10.12968/jowc.2014.23.11.521.

Zandim DL, Leite FR, da Silva VC, Lopes BM, Spolidorio LC, Sampaio JE. Wound healing of dehiscence defects following different root conditioning modalities: an experimental study in dogs. *Clin Oral Investig.* 2013 Jul;17(6):1585-93. doi: 10.1007/s00784-012-0848-4.

Zavan B, Brun P, Vindigni V, Amadori A, Habeler W, Pontisso P, et al. Extracellular matrix-enriched polymeric scaffolds as a substrate for hepatocyte cultures: In vitro and in vivo studies. *Biomaterials.* 2005 Dec;26(34):7038-45. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.067.

Zervas P, Lambrianidis T, Karabouta-Vulgaropoulou I. The effect of citric acid treatment on periodontal healing after replantation of permanent teeth. *Int Endod J* 1991;24(6):317-25.

Zhu W, Zhang Q, Zhang Y, Cen L, Wang J. PDL regeneration via cell homing in delayed replantation of avulsed teeth. *J Transl Med.* 2015 Nov 14;13:357. doi: 10.1186/s12967-015-0719-2.