

RESSALVA

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

20/03/2021



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

FELIPE DE SOUZA MATOS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIRREABSORTIVO DE GÉIS DE
FENTOLAMINA E PROPRANOLOL EM REIMPLANTES DENTÁRIOS**

2019

FELIPE DE SOUZA MATOS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIRREABSORTIVO DE GÉIS DE FENTOLAMINA
E PROPANOLOL EM REIMPLANTES DENTÁRIOS**

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.

Área: Endodontia. Linha de pesquisa: Traumatismo dental.

Orientador: Prof. Adj. Cláudio Antonio Talge Carvalho

Coorientadora: Profa. Dra. Renata Falchete do Prado

São José dos Campos

2019

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2019]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Matos, Felipe de Souza

Avaliação do potencial antirreabsortivo de géis de fentolamina e propranolol em reimplantes dentários / Felipe de Souza Matos. - São José dos Campos : [s.n.], 2019.

88 f. : il.

Tese (Doutorado) - - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2019.

Orientador: Cláudio Antonio Talge Carvalho

Coorientadora: Renata Falchete Prado

1. Avulsão dentária. 2. Reimplante dentário. 3. Reabsorção radicular. 4. Bloqueadores adrenérgicos. 5. Fentolamina. I. Carvalho, Cláudio Antonio Talge, orient. II. Prado, Renata Falchete, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Adj. Cláudio Antonio Talge Carvalho (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Adj. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Adj. Flaviana Bombarda de Andrade

Universidade de São Paulo (USP)

Faculdade de Odontologia de Bauru

Campus de Bauru

Profa. Dra. Gleyce Oliveira Silva

Faculdade Anhanguera

Departamento de Odontologia

Campus São José dos Campos

São José dos Campos, 20 de março de 2019.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Humberto Jorge Goes Matos e Ismênia de Souza Matos,
pela formação humana, amor, incentivo e apoio incondicional.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, meu refúgio e minha fortaleza.

A minha família, em especial meus irmãos **Elielba**, **Elaine** e **Jonatan**, pela união, carinho e amizade.

A minha avó **Anilda Nonato**, que nos deixou durante o meu doutorado, pela alegria, exemplo e carinho.

A **Alfrancio Dias**, pelo companheirismo, amizade, força e coragem.

A **Raphael Oliveira**, grande parceiro de viagens e saídas, pela amizade e incentivo.

À **Ayla Macyelle**, pela amizade que se fortaleceu no mestrado e nos uniu no doutorado, compartilhando a vida diária, os momentos de alegria e desafios.

À **Rayana Khoury**, grande amiga e parceira de pesquisa. A sua companhia diária tornou o doutorado mais leve e prazeroso.

À **Alessandra Manchini**, pela parceria e apoio mútuo.

Aos demais **amigos** e **colegas** da pós-graduação da Unesp, pela troca de experiências e aprendizado; pela amizade, motivação e momentos de descontração durante essa jornada.

Ao **Prof. Tit. Sigmar de Mello Rode**, pelo incentivo a minha formação na UNESP, pelo carinho e preocupação constantes durante todo o curso.

À **Profa. Tit. Márcia Carneiro Valera**, pelo exemplo de amor e dedicação à docência e à ciência, pelos ensinamentos, e por ter colaborado de forma significativa na minha formação acadêmica. Obrigado pela confiança depositada em mim e pelas oportunidades de experiência e crescimento profissional.

A minha coorientadora, **Profa. Dra. Renata Falchete do Prado**, a quem devo grande parte de tudo o que aprendi no doutorado como pesquisador. Sua capacidade científica e conhecimento amplo me inspiram. Obrigado por compartilhar todo o seu conhecimento e por me fazer "andar" sozinho.

Ao meu orientador, **Prof. Adj. Cláudio Antonio Talge Carvalho**, por toda experiência clínica e científica compartilhada. Obrigado pelo acolhimento, por me fazer sentir em casa, e por acreditar em mim e me apoiar em todos os meus objetivos. Sou muito feliz e grato por tê-lo como orientador.

Aos demais docentes da área de Endodontia, **Prof. Dr. Frederico Canato Martinho**, **Profa. Adj. Ana Paula Martins Gomes** e **Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo**, pelos ensinamentos que me foram concedidos.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora, em especial **Prof. Adj. Eduardo Bresciani**, pela disposição em sempre ajudar e compartilhar seus conhecimentos em estatística, além de experiência clínica e científica.

À **Profa. Adj. Luana Marotta Reis de Vasconcellos**, por quem tenho grande carinho, respeito e admiração, pelo apoio e críticas construtivas feitas no exame de qualificação que contribuíram para a melhoria da qualidade do trabalho.

Aos meus eternos mestres e amigos, **Profa. Adj. Maria Amália Gonzaga Ribeiro**, minha referência em Endodontia, por ter acreditado em mim e me incentivado a seguir carreira acadêmica, e **Prof. Adj. Luiz Renato Paranhos**, pela significativa contribuição na minha formação acadêmica e forte parceria.

Ao **Prof. Phillip Tomson**, por ter me recebido e me acolhido na University of Birmingham (Inglaterra), possibilitando a realização de um sonho e contribuindo para o meu crescimento pessoal e como pesquisador. Obrigado pela parceria, amizade e constante preocupação com minha felicidade e bem-estar.

À **Profa. Dra. Flávia Goulart da Rosa Cardoso**, pelo exemplo de competência e dedicação ao ensino em Endodontia. Obrigado pelo apoio e incentivo enquanto trabalhei ao seu lado como Professor Bolsista de Endodontia.

A todos os **funcionários** do Instituto de Ciência e Tecnologia da UNESP.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora**, na pessoa do coordenador **Prof. Adj. Alexandre Luiz Souto Borges**.

À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da Bolsa de Doutorado.

À **Faculdade de Odontologia de São José dos Campos** – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, seu **corpo docente, direção e administração**.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para execução desta pesquisa.

*"Pesquisa para constatar, constatando,
intervenção, intervindo educo e me educo.*

*Pesquisa para conhecer o que ainda não
conheço e comunicar ou anunciar a novidade."*

Paulo Freire

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 ARTIGO	15
2.1 Artigo – Matos FS, Khoury RD, Prado RF, Oliveira LD, Valera MC, Tomson PL, Carvalho CAT. Aplicação tópica de bloqueadores adrenérgicos em incisivos de ratos reimplantados tardiamente: avaliação citotóxica, microtomográfica e histomorfométrica / <i>Topical application of adrenergic blockers on late replanted rat incisors: cytotoxic, microtomographic and histomorphometric evaluation</i>	15
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS	39
REFERÊNCIAS	43
APÊNDICE	49
ANEXOS	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α 1-AR	Receptores α 1 Adrenérgicos
β 2-AR	Receptores β 2 Adrenérgicos
μ CT	Microtomografia Computadorizada
BSA	Soroalbumina Bovina
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CMC	Carboximetilcelulose
CO ₂	Dióxido de Carbono
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DAB	Diamino Benzidina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
HBSS	Solução Balanceada de Hanks
HE	Hematoxilina-eosina
HPDFL	Fibroblastos do Ligamento Periodontal Humano
LP	Ligamento Periodontal
OPG	Osteoprotegerina
RANK	Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa β
RANKL	Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa β
ROI	Região de Interesse
SNAS	Sistema Nervoso Autônomo Simpático
TRAP	Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato
VOI	Volume de Interesse

Matos FS. Avaliação do potencial antirreabsortivo de géis de fentolamina e propranolol em reimplantes dentários [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2019.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da aplicação tópica de fármacos bloqueadores adrenérgicos (AR) sobre o processo de reparo periodontal de dentes reimplantados em ratos. Inicialmente, cultura de fibroblastos do ligamento periodontal humano foi utilizada para avaliar qualitativamente a citotoxicidade de soluções etanólicas de fentolamina (bloqueador α -AR) e propranolol (bloqueador β -AR) em diferentes doses (0,75 $\mu\text{g/mL}$, 2,5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$), após 24 horas de exposição. Posteriormente, modelo animal de avulsão e reimplante dentário foi utilizado para avaliar o potencial antirreabsortivo do bloqueio adrenérgico local com géis de fentolamina (F) ou propranolol (P), em excipiente de carboximetilcelulose (CMC). Incisivos superiores direitos foram extraídos de 48 ratos Wistar machos, armazenados em guardanapo de papel por 30 minutos, e distribuídos aleatoriamente em oito grupos ($n=6$) de acordo com a medicação intracanal: F0.75, F10 e F100 receberam gel de fentolamina nas concentrações 0,75 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente; P2.5, P10 e P100 receberam gel de propranolol nas concentrações 2,5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente; HC e CMC receberam pasta de hidróxido de cálcio e gel de carboximetilcelulose, respectivamente. Os animais foram eutanasiados 30 dias após o reimplante e as seguintes análises foram realizadas: microtomografia (volume, superfície, proporção e densidade de tecido mineralizado), histomorfometria (áreas de reabsorção radicular inflamatória, reabsorção por substituição, anquilose e reparo periodontal) e histoquímica (atividade osteoclástica). Os dados foram analisados estatisticamente por meio de ANOVA e teste de Tukey ou Kruskal Wallis e teste de Dunn, de acordo com sua normalidade ($\alpha=5\%$). A análise qualitativa da viabilidade celular demonstrou que a dose de 100 $\mu\text{g/mL}$ dos fármacos apresentou alta citotoxicidade, com 100% das células inviáveis, e as demais doses propiciaram viabilidade celular semelhante. As análises microtomográfica e histomorfométrica das amostras *in vivo* não revelaram qualquer diferença estatística significativa entre os fármacos testados e suas diferentes doses ($p>0,05$). No entanto, P10 e F10 apresentaram qualitativamente um melhor resultado, pois foram os únicos grupos classificados com áreas de intenso reparo periodontal (P10) e de discreta reabsorção radicular inflamatória (F10 e P10). O tratamento com F10 e P10 diminuiu significativamente o número de osteoclastos em comparação com as outras medicações tópicas ($p<0,05$). Concluiu-se que a aplicação tópica de géis de fentolamina e propranolol na dose de 10 $\mu\text{g/mL}$ diminuiu significativamente a atividade osteoclástica sem causar efeitos citotóxicos.

Palavras-chave: Avulsão dentária. Reimplante dentário. Reabsorção radicular. Bloqueadores adrenérgicos. Fentolamina. Propranolol.

Matos FS. *Evaluation of the anti-resorptive potential of phentolamine and propranolol gels on tooth replantation [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2019.*

ABSTRACT

*This study aimed to evaluate the effects of topical application of adrenergic (AR) blocking drugs on the periodontal repair process of replanted teeth in rats. First, culture of human periodontal ligament fibroblasts was used to qualitatively assess the cytotoxicity of ethanolic solutions of phentolamine (α -AR blocker) and propranolol (β -AR blocker) at different doses (0.75 $\mu\text{g/mL}$, 2.5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ and 100 $\mu\text{g/mL}$) after 24 hours of exposure. Then, animal model of tooth avulsion and replantation was used to evaluate the anti-resorptive potential of local adrenergic blockade with phentolamine (Ph) or propranolol (Pr) gels, in carboxymethylcellulose excipient (CMC). Maxillary right incisors were extracted from 48 male Wistar rats, stored in paper napkins for 30 minutes, and randomly distributed into eight groups ($n = 6$) according to intracanal medication: Ph0.75, Ph10 and Ph100 received phentolamine gel at concentrations of 0.75 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ and 100 $\mu\text{g/mL}$, respectively; Pr2.5, Pr10 and Pr100 received propranolol gel at concentrations of 2.5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ and 100 $\mu\text{g/mL}$, respectively; CH and CMC received calcium hydroxide paste and carboxymethylcellulose gel, respectively. The animals were euthanized 30 days after replantation and the following analyzes were performed: microtomography (volume, surface, proportion and density of mineralized tissue), histomorphometry (areas of inflammatory root resorption, replacement root resorption, ankylosis and periodontal repair) and histochemistry (osteoclastic activity). Data were analyzed statistically by means of ANOVA and Tukey's test or Kruskal Wallis and Dunn's test, according to their normality ($\alpha = 5\%$). The qualitative analysis of cell viability demonstrated that the dose of 100 $\mu\text{g/mL}$ of the drugs presented high cytotoxicity, with 100% of the cells non-viable, and the other doses provided similar cell viability. Microtomographic and histomorphometric analyzes of *in vivo* samples did not reveal any significant statistical difference between the tested drugs and their different doses ($p > 0.05$). However, Pr10 and Ph10 presented qualitatively a better result, as they were the only groups classified with areas of intense periodontal repair (Pr10) and discrete inflammatory root resorption (Ph10 and Pr10). Treatment with Ph10 and Pr10 significantly decreased the number of osteoclasts compared to the other topical medications ($p < 0.05$). It was concluded that topical application of phentolamine and propranolol gels at a dose of 10 $\mu\text{g/mL}$ significantly decreased osteoclastic activity without causing cytotoxic effects.*

Keywords: Tooth avulsion. Tooth replantation. Root resorption. Adrenergic blockers. Phentolamine. Propranolol.

1 INTRODUÇÃO

Traumatismos dentários representam um sério problema de saúde pública, correspondendo a 5% de todas as lesões pelas quais as pessoas procuram atendimento (DiAngelis et al., 2012). A avulsão dental é considerada um dos mais graves, variando de 0,5 a 3% das lesões traumáticas na dentição permanente e os principais fatores etiológicos nessa dentição são as quedas e os esportes (Andersson et al., 2012). Os incisivos centrais superiores são os dentes mais comumente atingidos, ao passo que a mandíbula raramente é afetada. A idade mais frequente para ocorrência da avulsão é entre 7 e 12 anos de idade, fase essa em que os incisivos permanentes estão erupcionando. O reimplante e a manutenção do dente avulsionado em seu alvéolo são então essenciais até que o crescimento facial esteja completo, quando um tratamento reabilitador permanente pode ser feito (Trope, 2011). Por isso, em casos de avulsão dentária, sempre que possível, o reimplante deve ser o tratamento de escolha e o prognóstico dependerá do dente avulsionado, do tempo extra-alveolar e do meio em que o dente foi armazenado até o procedimento de reimplante, idade, estágio de formação radicular, entre outros fatores. Quando realizado em até 15 minutos após o traumatismo, o reimplante é considerado imediato e o prognóstico é mais favorável (Andersson, Bodin, 1990; Petrovic et al., 2010; Andersson et al., 2012; Khinda et al., 2017). Se o reimplante imediato não for possível, o dente avulsionado deve ser armazenado em um meio que favoreça a prevenção de mais danos aos tecidos. Meios de cultura (Viaspan ou HBSS), leites, solução salina e saliva são, em ordem de preferência, meios recomendados para armazenar dentes avulsionados antes do reimplante (Trope, 2002; Petrovic et al., 2010; Andersson et al., 2012).

No entanto, mesmo respeitando as condições ideais de tempo e armazenamento extra-alveolar, o sucesso do reimplante dentário é limitado. Grande parte dos dentes reimplantados é perdida principalmente pela ocorrência de reabsorção radicular externa, interna e anquilose, o que incita a busca por outras estratégias de tratamento na tentativa de prevenir ou minimizar as complicações decorrentes do trauma e, conseqüentemente, manter o dente no alvéolo por um período mais longo (Andreasen et al., 1995a, 1995b; Hecova et al., 2010; Petrovic et

al., 2010; Andersson et al., 2012; Holan, 2013; Roskamp et al., 2018). Apesar de já existirem relatos de que diversos protocolos de tratamento da superfície radicular, como laserterapia e aplicação de bifosfonatos, melhoram o processo de reparo periodontal em dentes reimplantados (Carvalho et al., 2012, 2016, 2017; Vilela et al., 2012; Matos et al., 2016; Najeeb et al., 2017), seus efeitos ainda são restritos aos modelos animais e inconclusivos devido às diferenças nos protocolos terapêuticos, modelos experimentais e ao grande número de variáveis que podem alterar a resposta dos tecidos biológicos. Além disso, nenhum deles foi capaz de impedir completamente a instalação de processos reabsortivos e melhorar a sobrevivência de dentes avulsionados. Estima-se que 60 a 85% dos dentes reimplantados sejam reabsorvidos e perdidos 4 a 6 anos após a lesão (Wimolsantirungsri et al., 2018; Andreasen et al., 1995c).

O mecanismo de inibição das reabsorções tem sido atribuído ao decréscimo da atividade osteoclástica por recrutamento diminuído de clastos, à interferência sobre os receptores específicos dos osteoclastos para proteínas da matriz óssea, à produção de um inibidor osteoclástico por osteoblastos, que reduzem o tempo de vida e/ou o número de osteoclastos diferenciados, e à paralização da reabsorção pela interferência com o bordo pregueado dos osteoclastos (Trope, 2011; Panzarini et al., 2013; Bastos et al., 2015, 2017; Ahn et al., 2016). Como visto na literatura, uma das vias comuns de secreção de moléculas moduladoras da reabsorção óssea é através de receptores ligantes (sistema RANK/RANKL/OPG) presentes em células secretoras de citocinas. O RANK e seu ligante (RANKL) desempenham papel fundamental no desenvolvimento dos osteoclastos. A ligação do RANKL, expresso na superfície dos osteoblastos, ao seu receptor RANK, expressado na superfície de monócitos, impulsionam sinais de diferenciação dos monócitos em osteoclastos (osteoclastogênese), promovendo a reabsorção óssea. A osteoprotegerina (OPG), outra proteína expressa na superfície dos osteoblastos, inibe a diferenciação e atividade dos osteoclastos ligando-se ao RANKL e impedindo sua ligação ao RANK, preservando a integridade óssea (Saito et al., 2011; Panzarini et al., 2013).

Um achado interessante de pesquisas nas últimas décadas é de que a liberação de neurotransmissores adrenérgicos, como a adrenalina e a noradrenalina, e sua ligação aos receptores para tais neurotransmissores, entre eles o receptor adrenérgico β_2 (β_2 -AR), presente na superfície de osteoblastos e outras células do

ligamento periodontal (LP), parece regular a remodelação óssea, estando esta, então, sob controle do sistema nervoso autônomo simpático (SNAS). Evidências demonstram que esse sistema regula de forma negativa e positiva a formação e reabsorção óssea, respectivamente, através da sinalização de β 2-AR que, ao se ligar ao neurotransmissor adrenérgico, aumenta a expressão de RANKL, estimulando a diferenciação osteoclástica (Ducy et al., 2000; Takeuchi et al., 2001; Takeda et al., 2002; Togari, 2002, 2005; Harada et al., 2003; Elefteriou et al., 2005). Alguns estudos comprovaram que ratos com simpatectomia química periférica ou com bloqueio químico de receptores β 2-AR por administração de propranolol (β -bloqueador) exibiram redução significativa da perda óssea alveolar e inibição da progressão da periodontite em um modelo experimental de doença periodontal (Breivik et al., 2005; Rodrigues et al., 2012). Fonseca et al. (2011) relataram que os receptores β 2-AR não são os únicos adrenoreceptores envolvidos na regulação da remodelação óssea e mostrou que a sinalização pelos receptores α 1 (α 1-AR) também pode mediar as ações do SNAS nos tecidos mineralizados. O bloqueio α 1-AR utilizando a fentolamina também foi identificado como um alvo terapêutico potencial para o tratamento da doença periodontal, pois foi capaz de reduzir significativamente as citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e IL-8 no periodonto inflamado de ratos (Lu et al., 2014).

Estes achados sugerem que o SNAS afeta principalmente a reabsorção óssea e não a sua formação. Essa afirmação foi confirmada pela demonstração de que o propranolol reduz os marcadores de osteoclastos, mas não afeta a osteocalcina sérica em camundongos ovariectomizados (Pierroz et al., 2006). Desse modo, bloqueadores adrenérgicos como a fentolamina e o propranolol se mostram como substâncias com potencial terapêutico no tratamento de processos reabsortivos, podendo apresentar efeitos positivos não só na regulação da reabsorção óssea (Pasco et al., 2004; Schlienger et al., 2004; Wiens et al., 2006; Bonnet et al., 2007), como também da reabsorção radicular em dentes reimplantados. No entanto, até o momento, nenhum estudo avaliou a interferência dessa via de sinalização sobre a patogênese inflamatória pós-avulsão e reimplante dentário, bem como os possíveis benefícios de seu controle por meio de bloqueadores farmacológicos adrenérgicos. Essa investigação é de grande relevância porque protocolos de tratamento de dentes avulsionados e reimplantados

como os que foram analisados neste estudo nunca foram testados anteriormente quanto ao seu potencial em reduzir a ocorrência de reabsorção radicular e favorecer o processo de reparo após o reimplante.

Nesse contexto, fundamentada a participação da via de sinalização adrenérgica na patogênese inflamatória periodontal e os efeitos terapêuticos de bloqueadores adrenérgicos sobre o metabolismo ósseo, a presente pesquisa avaliou, *in vitro*, a citotoxicidade de fármacos bloqueadores α -adrenérgico (fentolamina) e β -adrenérgico (propranolol) sobre fibroblastos do ligamento periodontal humano (HPDFL) e, *in vivo*, o potencial antirreabsortivo ósseo-dentário do bloqueio adrenérgico local com aplicação tópica de géis de fentolamina e propranolol no reimplante dentário tardio em ratos.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Avulsão dental é uma lesão traumática complexa caracterizada pelo completo deslocamento do dente para fora do alvéolo, expondo-o ao ambiente externo e causando rompimento do feixe neurovascular e do LP. Como consequências, tanto a polpa quanto o LP sofrem extenso dano e se instala um processo inflamatório no periodonto. No exsudato inflamatório é encontrada uma grande quantidade de produtos, como os derivados do sistema de coagulação e fibrinólise, do ácido araquidônico, citocinas, fatores de crescimento, e óxido nítrico (Andersson et al., 2012). Todos são importantes mediadores locais indutores de osteoclasia. O principal deles, a plasmina, interage com os osteoblastos liberando a colagenase que promove perda total do osteóide aposto na superfície óssea. Assim, os cristais de hidroxiapatita ficam expostos e parecem exercer um efeito quimiotático para os clastos que, uma vez acoplados à superfície desnuda da raiz, caracterizam a instalação da unidade modeladora óssea, levando à reabsorção progressiva da estrutura radicular e perda do reimplante (Pierce et al., 1989). Dessa forma, o controle da inflamação e das vias de sinalização envolvidas na osteoclastogênese é fundamental para que ocorra o processo de reparo periodontal após o reimplante (Consolaro, 2013).

Estudos realizados na área da Periodontia demonstraram que, entre os diferentes mecanismos inatos de controle da imunopatogênese periodontal, o SNAS desempenha papel importante por regular a resposta inflamatória e o metabolismo ósseo em condições de saúde e doença (Breivik et al., 2005; Okada et al., 2010; Rodrigues et al., 2012; Lu et al., 2014). Evidências atuais indicam que a administração de agonistas e antagonistas de receptores α 1-AR e β 2-AR são capazes de regular de forma positiva e negativa, respectivamente, a reabsorção óssea no periodonto, afetando significativamente a progressão da doença periodontal (Okada et al., 2010; Shimizu et al., 2011; Rodrigues et al., 2012; Lu et al., 2014). Diante disso, a presente pesquisa testou a hipótese de que o bloqueio adrenérgico local utilizando géis de fentolamina (bloqueador não seletivo α 1-AR) e propranolol (bloqueador não seletivo β 2-AR) como medicação tópica temporária teria efeitos benéficos na regulação da reabsorção óssea e radicular em incisivos de ratos

reimplantados tardiamente. Para isso, foram realizados três tipos de análises: microtomográfica, histomorfométrica e histoquímica. Métodos histomorfométricos de análise têm sido adotados pela maioria dos estudos *in vivo* e, embora sejam considerados adequados para avaliar o processo de reparo dos tecidos dentais e periodontais, optou-se por sua complementação com a análise microtomográfica devido às limitações dos métodos 2D (Saito et al., 2011; Carvalho et al., 2012; Vilela et al., 2012; Reis et al., 2014; Matos et al., 2016). A microtomografia computadorizada é um método que permite uma varredura volumétrica precisa e representa uma importante ferramenta para avaliação morfométrica (Reis et al., 2014). A análise histoquímica por meio da contagem de células multinucleadas com reação positiva à TRAP foi essencial para demonstrar o efeito dos fármacos e suas diferentes doses sobre a formação e atividade dos osteoclastos, que são células diretamente envolvidas e responsáveis pelo processo de reabsorção da raiz após o reimplante (Tronstad, 1988; Hammarstrom et al., 1989; Shimizu et al., 2011; Rodrigues et al., 2012; Roskamp et al., 2018).

Os resultados deste estudo revelaram que a aplicação tópica de fentolamina e propranolol na dose de 10 µg/mL inibiu parcialmente a atividade osteoclástica, pois foi encontrada menor quantidade de células multinucleadas TRAP-positivas nas amostras que receberam esse tratamento. Esses dados suportam a hipótese de que o uso de bloqueadores adrenérgicos pode influenciar o processo de reparo periodontal de dentes reimplantados, embora evidências histológicas significativas de atividade antirreabsortiva não tenham sido encontradas. O bloqueio dos receptores α 1-AR e β 2-AR presentes na superfície de osteoblastos é sugerido como o mecanismo pelo qual os fármacos suprimem a osteoclastogênese. Quando bloqueados por via farmacológica, os receptores α 1-AR e β 2-AR não se ligam aos neurotransmissores adrenérgicos e a expressão de RANKL, o principal indutor da atividade osteoclástica, é conseqüentemente reduzida (Togari, 2002; Breivik et al., 2005; Fonseca et al., 2011; Shimizu et al., 2011; Rodrigues et al., 2012; Lu et al., 2014). No entanto, o delineamento experimental do presente trabalho não permite afirmar que a supressão da osteoclastogênese pelos fármacos foi resultante do bloqueio desses receptores. É preciso esclarecer se o mecanismo pelo qual a aplicação tópica de fentolamina e propranolol influencia a diferenciação de monócitos em osteoclastos é de fato devido ao bloqueio α 1-AR e β 2-AR ou devido a

um efeito anti-inflamatório geral como, por exemplo, suprimindo a liberação de citocinas inflamatórias.

Embora cães e macacos representem o modelo animal mais apropriado para estudos em traumatologia dental, ratos foram escolhidos como modelo experimental, pois são mais utilizados devido à fácil manipulação e à existência de uma metodologia definida para reproduzir avulsão e reimplante (Andreasen et al., 2011). Além disso, esses animais possuem metabolismo mais acelerado, permitindo observar os mecanismos de reparo em um curto período de tempo (Saito et al., 2011; Carvalho et al., 2012; Vilela et al., 2012). Na presente investigação, os animais foram eutanasiados em 30 dias após o reimplante porque esse período é suficiente para observar os processos inflamatório e de reparo (Carvalho et al., 2012; Vilela et al., 2012; Matos et al., 2016), já que o reparo do ligamento periodontal ocorre entre 2 e 4 semanas após o reimplante (Panzarini et al., 2013). No entanto, a maioria dos estudos experimentais *in vivo* que investigaram o uso de substâncias ou medicações intracanaís no reimplante dentário, tem analisado os parâmetros de reparo periodontal em períodos maiores de observação, geralmente entre 60 e 90 dias (Trevisan et al., 2011; Mori et al., 2013; Panzarini et al., 2014; Esteves et al., 2015; Yoo et al., 2015; Ferreira et al., 2017; Brandini et al., 2018). Assim, a utilização de um único tempo experimental no presente estudo pode ser considerada uma das limitações do trabalho. Além disso, pode-se inferir que a utilização de um período experimental mais curto em relação à maioria dos trabalhos publicados na área de traumatismos dentários pode ter subestimado os efeitos a longo prazo do bloqueio adrenérgico quando comparado a outras formas de tratamento. O potencial antirreabsortivo dos géis de fentolamina e propranolol decorrentes do efeito antiosteoclastogênico observado neste estudo, em especial nas doses de 10 µg/mL, poderia ter sido evidente, histologicamente, em um tempo maior de análise. O tempo experimental de 30 dias talvez não tenha sido suficiente para observar diferenças estatisticamente significantes entre os grupos quanto aos parâmetros histomorfométricos e microtomográficos investigados. Semelhantemente, Yoo et al. (2015) analisaram o efeito do zoledronato, um fármaco da classe dos bifosfonatos, na progressão da reabsorção radicular externa após reimplante em ratos, nos tempos experimentais de 30 e 60 dias, mas só encontraram efeitos significativos do fármaco no período de 60 dias.

O SNAS regula os mecanismos de resposta imune e inflamatória periodontal especialmente via receptores α 1-AR e β 2-AR (Lu et al., 2014). No entanto, é sabido que outros tipos e subtipos de receptores adrenérgicos estão presentes nas células do ligamento periodontal e que bloqueadores adrenérgicos inespecíficos, como os que foram utilizados neste estudo, podem se ligar a outros subtipos de receptores e, conseqüentemente, diminuir seu mecanismo de ação via α 1-AR e β 2-AR, mas essa seletividade pode variar dependendo da dose (Bonnet et al., 2008; Lu et al., 2014). A fentolamina liga-se tanto a receptores α 1-AR e α 2-AR, enquanto o propranolol se liga a receptores β 1-AR e β 2-AR (Okada et al., 2010; Rodrigues et al., 2012; Lu et al., 2014). Assim, embora estudos anteriores tenham observado efeitos benéficos na doença periodontal com a utilização de fentolamina e propranolol, fármacos de segunda ou terceira geração, que são bloqueadores seletivos α 1-AR e β 2-AR devem ser considerados em futuros trabalhos. Além disso, é preciso estabelecer a biodisponibilidade dos géis no periodonto para definir a relação entre a concentração liberada e o efeito farmacodinâmico.

De forma geral, podemos dizer que, apesar dos medicamentos utilizados no presente estudo não apresentarem efeitos significativos na redução da reabsorção radicular no período experimental de 30 dias, o bloqueio adrenérgico local representa uma importante via de modulação da atividade clástica e imunopatogênese inflamatória periodontal após replante dentário, pois houve uma redução significativa da osteoclastogênese em amostras tratadas com 10 μ g/mL dos fármacos. Os achados desse estudo pioneiro com uso de géis de fentolamina e propranolol representam dados preliminares que servirão de base para futuros experimentos *in vitro* e *in vivo*, necessários para demonstrar mais precisamente os benefícios do bloqueio adrenérgico local no processo de reparo de dentes reimplantados.

REFERÊNCIAS*

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;26(4):301-9. doi: 10.1111/ipd.12211.

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. doi: 10.1111/j.1600-9657.2012.01125.x.

Andersson L, Bodin I. Avulsed human teeth replanted within 15 minutes: a long-term clinical follow-up study. *Endod Dent Traumatol*. 1990;6(1):37-42. PubMed PMID: 2390966.

Andreasen JO, Andersson L. Critical considerations when planning experimental in vivo studies in dental traumatology. *Dent Traumatol*. 2011;27(4):275-80. doi: 10.1111/j.1600-9657.2011.00983.x.

Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 1. Diagnosis of healing complications. *Endod Dent Traumatol*. 1995a;11(2):51-8. PubMed PMID: 7641619.

Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 2. Factors related to pulpal healing. *Endod Dent Traumatol*. 1995b;11(2):59-68. PubMed PMID: 7641620.

Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 4. Factors related to periodontal ligament healing. *Endod Dent Traumatol*. 1995c;11(2):76-89. PubMed PMID: 7641622.

Bastos JV, Côrtes MIS, Silva JF, Goulart EMA, Colosimo EA, Gomez RS, et al. A study of the interleukin-1 gene cluster polymorphisms and inflammatory external root resorption in replanted permanent teeth. *Int Endod J*. 2015;48(9):878-87. doi: 10.1111/iej.12384.

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;43(2):203-209. doi: 10.1016/j.joen.2016.10.018.

Bonnet N, Benhamou CL, Beaupied H, Laroche N, Vico L, Dolleens E, et al. Doping dose of salbutamol and exercise: deleterious effect on cancellous and cortical bones in adult rats. *J Appl Physiol* (1985). 2007;102(4):1502-9. PubMed PMID: 17185495. doi: 10.1152/jappphysiol.00815.2006.

* 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

Bonnet N, Benhamou CL, Malaval L, Goncalves C, Vico L, Eder V, et al. Low dose beta-blocker prevents ovariectomy-induced bone loss in rats without affecting heart functions. *J Cell Physiol.* 2008;217(3):819-27. doi: 10.1002/jcp.21564.

Brandini DA, Amaral MF, Debortoli CVL, Panzarini SR. Immediate tooth replantation: root canal filling for delayed initiation of endodontic treatment. *Braz Oral Res.* 2018;32:e7. doi: 10.1590/1807-3107/2018.vol32.0007.

Breivik T, Gundersen Y, Opstad PK, Fonnum F. Chemical sympathectomy inhibits periodontal disease in Fischer 344 rats. *J Periodontal Res.* 2005;40(4):325–30. doi: 10.1111/j.1600-0765.2005.00803.x.

Bros F, Wolshin EM. Determination of phentolamine in blood and urine by high performance liquid chromatography. *Anal Chem.* 1978;50(3):521–5. PubMed PMID: 637302.

Carvalho EDS, 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. doi: 10.1111/j.1600-9657.2011.01108.x.

Carvalho EDS, Rosa RH, Pereira FM, Anbinder AL, Mello I, Habitante SM, et al. Effects of diode laser irradiation and fibroblast growth factor on periodontal healing of replanted teeth after extended extra -oral dry time. *Dent Traumatol.* 2017;33(2):91-99. doi: 10.1111/edt.12308.

Carvalho FB, Andrade AS, Barbosa AFS, Aguiar MC, Cangussu MCT, Pinheiro ALB, et al. Evaluation of laser phototherapy (780 nm) after dental replantation in rats. *Dent Traumatol.* 2016;32:488-494. doi: 10.1111/edt.12289.

Consolaro A. The four mechanisms of dental resorption initiation. *Dental Press J Orthod.* 2013;18(3):7–9. PubMed PMID: 24094007.

Diangelis AJ, Andreasen JO, Ebeleseder KA, Kenny DJ, Trope M, Sigurdsson A, et al. International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 1. Fractures and luxations of permanent teeth. *Dent Traumatol.* 2012;28(1):2-12. doi: 10.1111/j.1600-9657.2011.01103.x.

Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell.* 2000;100(2):197-207. PubMed PMID: 10660043.

Eccles JD. The development of the periodontal membrane in the rat incisor. *Arch Oral Biol.* 1964;9(2):127–33.

Eleftheriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, et al. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature.* 2005;434(7032):514-20. PubMed PMID: 15724149.

Esteves JC, Marão HF, Silva PI, Poi WR, Panzarini SR, Aranega AM, et al. Delayed tooth replantation following root canal filling with calcium hydroxide and MTA: histomorphometric study in rats. *Arch Oral Biol.* 2015;60(9):1254-62. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.02.002.

Ferreira MM, Botelho MF, Abrantes M, Carvalho L, Carrilho E. Histologic evaluation of the effect of mineral trioxide aggregate-Fillapex as a root canal sealer in rat teeth submitted to late replantation. *Eur J Dent.* 2017;11(1):89-93. doi: 10.4103/ejd.ejd_106_16.

Fonseca TL, Jorgetti V, Costa CC, Capelo LP, Covarrubias AE, Moulatlet AC, et al. Double disruption of alpha2A- and alpha2C-adrenoceptors results in sympathetic hyperactivity and high-bone-mass phenotype. *J Bone Miner Res.* 2011;26(3):591-603. doi: 10.1002/jbmr.243.

Gugler R, Bodem G, Dengler HJ. Pharmacokinetics of beta-receptor-blocking agents in relation to their anti-hypertensive effect. *Clin Sci Mol Med Suppl.* 1976;3:473s-75s. PubMed PMID: 15758.

Hammarstrom L, Blomlof L, Lindskog S. Dynamics of dentoalveolar ankylosis and associated root resorption. *Endod Dent Traumat.* 1989;5:163-75. PubMed PMID: 2517781.

Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature.* 2003;423(6937):349-55. PubMed PMID: 12748654.

Hecova H, Tzigkounakis V, Merglova V, Netolicky J. A retrospective study of 889 injured permanent teeth. *Dent Traumatol.* 2010;26(6):466-75. doi: 10.1111/j.1600-9657.2010.00924.x.

Hiremath G, Kidiyoor KH. Avulsion and storage media. *J Investig Clin Dent.* 2011;2(2):89-94. doi: 10.1111/j.2041-1626.2010.00043.x.

Holan G. Replantation of avulsed primary incisors: a critical review of a controversial treatment. *Dent Traumatol.* 2013;29(3):178-84. doi: 10.1111/edt.12038.

Khinda VI, Kaur G, Brar GS, Kallar S, Khurana H. Clinical and practical implications of storage media used for tooth avulsion. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2017;10(2):158-165. doi: 10.5005/jp-journals-10005-1427.

Lu H, Xu M, Wang F, Liu S, Gu J, Lin S. Chronic stress enhances progression of periodontitis via α 1-adrenergic signaling: a potential target for periodontal disease therapy. *Exp Mol Med.* 2014;46:e118. doi: 10.1038/emm.2014.65.

Matos FS, Godolphim FJ, Correia AMO, de Albuquerque Júnior RLC, Paranhos LR, Rode SM, et al. Effect of laser photobiomodulation on the periodontal repair process of replanted teeth. *Dent Traumatol.* 2016; 32:402-408. doi: 10.1111/edt.12276.

Mori GG, Janjácómo DMM, Castilho LR, Poi WR. Evaluating the knowledge of sports participants regarding dental emergency procedures. *Dent Traumatol.* 2009;25(3):305–8. doi: 10.1111/j.1600-9657.2009.00786.x.

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

Mori GG, Turcio KHL, Borro VPB, Mariusso AM. Evaluation of the knowledge of tooth avulsion of school professionals from Adamantina, São Paulo, Brazil. *Dent Traumatol.* 2007;23(1):2–5. doi: 10.1111/j.1600-9657.2005.00391.x.

Najeeb S, Siddiqui F, Khurshid Z, Zohaib S, Zafar MS, Ansari SA. Effect of bisphosphonates on root resorption after tooth replantation - a systematic review. *Dent Traumatol.* 2017;33(2):77 -83. doi: 10.1111/edt.12316.

Okada Y, Hamada N, Kim Y, Takahashi Y, Sasaguri K, Ozono S, et al. Blockade of sympathetic B-receptors inhibits *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss in an experimental rat periodontitis model. *Arch Oral Biol.* 2010;55(7):502–8. doi: 10.1016/j.archoralbio.2010.04.002.

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. doi: 10.1111/j.1600-9657.2012.01127.x.

Panzarini SR, Sonoda CK, Saito CT, Hamanaka EF, Poi WR. Delayed tooth replantation: MTA as root canal filling. *Braz Oral Res.* 2014;28:1-7. PubMed PMID: 25337936.

Pasco JA, Henry MJ, Sanders KM, Kotowicz MA, Seeman E, Nicholson GC. Beta-adrenergic blockers reduce the risk of fracture partly by increasing bone mineral density: Geelong Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res.* 2004;19(1):19-24. PubMed PMID: 14753732.

Petrovic B, Marković D, Peric T, Blagojevic D. Factors related to treatment and outcomes of avulsed teeth. *Dent Traumatol.* 2010;26(1):52-9. doi: 10.1111/j.1600-9657.2009.00836.x.

Pierce AM. Experimental basis for the management of dental resorption. *Endod Dent Traumatol.* 1989;5(6):255–65. PMID: 2701095.

Pierroz DD, Boussein ML, Rizzoli R, Ferrari SL. Combined treatment with a beta-blocker and intermittent PTH improves bone mass and microarchitecture in ovariectomized mice. *Bone.* 2006;39(2):260-7. doi: 10.1016/j.bone.2006.01.145.

Reis MVP, Moura CC, Soares PB, Leoni GB, Souza-Neto MD, Barbosa DZ, et al. Histologic and micro-computed tomographic analyses of replanted teeth stored in different kind of media. *J Endod.* 2014;40(5):665-9. doi: 10.1016/j.joen.2013.09.023.

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. doi: 10.1111/j.1600-9657.2009.00767.x.

Rodrigues WF, Madeira MF, da Silva TA, Clemente-Napimoga JT, Miguel CB, Dias-da-Silva VJ, et al. Low dose of propranolol down-modulates bone resorption by inhibiting inflammation and osteoclast differentiation. *Br J Pharmacol.* 2012;165(7):2140-51. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01686.x.

Roskamp L, Trevilatto PC, Souza CM, Silva Neto UX, Carneiro E, Fariniuk LF, et al. Analysis of the association of clinical factors and IL4 gene polymorphisms with root resorption in avulsed teeth after 1 year of replantation. *Int Endod J.* 2018;51(1):12-19. doi: 10.1111/iej.12797.

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;27(1):30–9. doi: 10.1111/j.1600-9657.2010.00946.x.

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. doi: 10.1111/j.1600-9657.2008.00723.x.

Schlienger RG, Kraenzlin ME, Jick SS, Meier CR. Use of beta-blockers and risk of fractures. *JAMA.* 2004;292(11):1326-32. PubMed PMID: 15367554.

Shimizu Y, Hosomichi J, Kaneko S, Shibutani N, Ono T. Effect of sympathetic nervous activity on alveolar bone loss induced by occlusal hypofunction in rats. *Arch Oral Biol.* 2011;56(11):1404-11. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.05.004.

Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell.* 2002;111(3):305-17. PubMed PMID: 12419242.

Takeuchi T, Tsuboi T, Arai M, Togari A. Adrenergic stimulation of osteoclastogenesis mediated by expression of osteoclast differentiation factor in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Biochem Pharmacol.* 2001;61(5):579-86. PubMed PMID: 11239501.

Takka S, Rajbhandari S, Sakr A. Effect of anionic polymers on the release of propranolol hydrochloride from matrix tablets. *Eur J Pharm Biopharm.* 2001;52(1):75-82. PubMed PMID: 11438426.

Togari A, Arai M, Kondo A. The role of the sympathetic nervous system in controlling bone metabolism. *Expert Opin Ther Targets.* 2005;9(5):931-40. PubMed PMID: 16185149.

Togari A. Adrenergic regulation of bone metabolism: possible involvement of sympathetic innervation of osteoblastic and osteoclastic cells. *Microsc Res Tech.* 2002;58(2):77-84. PubMed PMID: 12203706.

Trevisan CL, Panzarini SR, Brandini DA, Poi WR, Luvizuto ER, dos Santos CL, et al. Calcium hydroxide mixed with camphoric p-monochlorophenol or chlorhexidine in delayed tooth replantation. *J Craniofac Surg.* 2011;22(6):2097-101. doi: 10.1097/SCS.0b013e3182326de4.

Tronstad L. Root resorption – etiology, terminology and clinical manifestations. *Endod Dent Traumat.* 1988;4(6):241-52. doi: 10.1111/j.1600-9657.1988.tb00642.x.

Trope M. Avulsion of permanent teeth: theory to practice. *Dent Traumatol.* 2011;27:281-294. doi: 10.1111/j.1600-9657.2011.01003.x.

Trope M. Clinical management of the avulsed tooth: present strategies and future directions. *Dent Traumatol.* 2002;18:1-11. PubMed PMID: 11841460.

Vilela RG, Gjerde K, Frigo L, Leal 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.* 2012;27(3):551–7. doi: 10.1007/s10103-011-0937-7.

Wiens M, Etminan M, Gill SS, Takkouche B. Effects of antihypertensive drug treatments on fracture outcomes: a meta-analysis of observational studies. *J Intern Med.* 2006;260(4):350-62. PubMed PMID: 16961672.

Wimolsantirungsri N, Makeudom A, Louwakul P, Sastraruji T, Chailertvanitkul P, Supanchart C, et al. Inhibitory effect of Thai propolis on human osteoclastogenesis. *Dent Traumatol.* 2018. doi: 10.1111/edt.12401.

Yoo JE, Kim MS, Kwon YD, Kim EC, Kim KC, Choi SC. Could zoledronic acid prevent root resorption in replanted rat molar? *Dent Traumatol.* 2015;31(6):465-70. doi: 10.1111/edt.12202.