

*L*UCIANA *R*EICHERT DA *S*ILVA *A*SSUNÇÃO

RESPOSTA TECIDUAL DE DENTES REIMPLANTADOS
UTILIZANDO PLASMA POBRE EM PLAQUETAS,
PLASMA RICO EM PLAQUETAS E CÉLULAS-TRONCO
DA MEDULA ÓSSEA. ESTUDO EM CÃES.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita
Filho" - UNESP como parte dos requisitos para a
obtenção do título de DOUTOR EM
ODONTOPEDIATRIA

Orientador: Prof. Dr. Célio Percinoto

Co-Orientador: Prof. Dra. Sandra Helena Penha de Oliveira

ARAÇATUBA
2009

Dados Curriculares

LUCIANA REICHERT DA SILVA ASSUNÇÃO

NASCIMENTO.....:	02.06.1976- LONDRINA/PR
FILIAÇÃO.....:	Jair Poeiras Assunção Maricley Reichert da Silva Assunção
1995/1999.....:	Curso de Graduação, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUC/PR, Curitiba-PR
2000/2001.....:	Curso de Aperfeiçoamento em Odontologia para Bebês, Bebê Clínica, Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina-PR
2001/2002.....:	Curso de Especialização em Odontopediatria, Universidade Norte do Paraná, UNOPAR, Londrina-PR
2004/2005.....:	Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, nível de Mestrado, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP
2006/2009.....:	Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, nível de Doutorado, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP
2009	Professora Assistente da Disciplina de Odontopediatria, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará (UFPA)

Dedicatória

Dedico este trabalho:

Ao meu Deus,

Antes daqueles que mais amo aqui, Àquele que têm me surpreendido a cada dia com Sua fidelidade e Seu amor por mim. Minha doce companhia em todos os momentos. Meu abrigo, meu refúgio, o motivo maior de minha alegria.

Dedico este trabalho Àquele que tem tornado meus sonhos realidade, e, sendo este a realização de um grande sonho:

Toda a Glória, a Honra e os Louvores a Ti!!!

*“Que o Cordeiro receba
A recompensa do Seu sofrimento
Que o Cordeiro receba
A recompensa através de mim
Só pela graça isso acontecerá
Entregar minha vida é um dom do Senhor
E ao Cordeiro que reina entre nós
Eu dou minha vida
Como oferta”*

*Clamor pelas Nações
(Cindy Huakere)*

Aos meus pais, Jair e Maricley,

As palavras somem ao tentar expressar minha profunda gratidão por tudo o que representam em minha vida. Usar palavras neste momento torna-se insuficiente para expressar o quanto eu os amo e o quanto eu sou eternamente agradecida por tudo o que fizeram e fazem pela minha vida. Minha dedicatória e a honra que merecem é o mínimo que poderia trazer a vocês. Aonde quer que eu esteja, o que mais que eu conquiste, é consequência de lágrimas, suor e muito trabalho pela minha vida!! Obrigada por tudo!

*“Filho meu, ouve a instrução de teu pai, e não deixes o ensinamento de tua mãe.
(...) Apega-te à instrução e não a largues; guarda-a, porque ela é a tua vida.”*

Provérbios 1,8; 4,13

Ao meu avô, Jair Assunção,

Um homem de poucas palavras, mas com um coração que grita em favor do próximo. Seu exemplo de esforço e trabalho vão estar sempre encravados no meu coração. Sou eternamente grata por tudo o que já fez por mim. Se eu pudesse reverter essas palavras em alívio do sofrimento que tens passado, eu certamente escreveria mais de um milhão. Fica aqui só minha oração e o desejo de que tudo isso se torne em eterna alegria!

Ao meu avô, Jurandyr Moraes da Silva (In Memoriam)

Jamais vou esquecer-me da conversa decisiva em que resultou neste momento.

Um importante passo, minha carreira profissional:

“Vô, o que devo fazer?” Seguiram as sábias palavras de um homem excepcional em que este mundo teve o privilégio de ser pisado.

Um médico não só de patologias físicas, mas usado para curar vidas sem esperança.

Seu exemplo ecoa até hoje em nossas vidas de uma maneira tão forte.

Sinto muitas saudades...

*Aos meus irmãos, Juliana, Adriana, Fabiana
Tatiana, Rodrigo e Thiago,*

*Somos realmente um time! (risos). Saibam que ter vocês
em minha vida é mais do que um presente,
é uma dádiva de Deus!*

*Nossa amizade, fruto de momentos de alegria e tristeza,
tem sido a força para que eu passe por este momento de mudanças.
Vou sempre amar vocês!!*

Ao meu noivo e futuro esposo, Fernando,

*O homem que Deus me presenteou para ser meu eterno
companheiro e melhor amigo. Uma pessoa que não mede esforços
para me abençoar e que esteve presente comigo em cada passo, em
cada letra deste trabalho, me ajudando com seu amor e paciência.*

Obrigada por existir em minha vida, meu amor!

Vou te amar para sempre!

*“Amor de Família é a coisa mais inexplicável do mundo, nem um pai consegue dizer para um
filho o quanto o ama, nem o filho sabe dizer ao pai, então eles simplesmente demonstram ...”*

Pasini

Agradecimentos Especiais

*Ao Professor Dr. Célio Percinoto, orientador deste trabalho,
pela disposição e acessibilidade em que sempre me recebeu.
Pelo exemplo e reconhecidas experiência e competência.
Suas experientes palavras em momentos de desafios
foram indispensáveis para a realização
deste trabalho. Muito obrigada!*

*À Professora Dra. Sandra Helena Penha de Oliveira,
um exemplo de extrema dedicação à profissão.
Sua inteligência, competência e amor pelo que faz,
foram a mola propulsora deste trabalho.
Seus ensinamentos não foram apenas para que eu entendesse
uma área totalmente nova para mim, mas uma lição de vida!
Meus mais sinceros agradecimentos...*

*Ao Professor Dr. Celso Koogi Sonoda,
um exemplo de Mestre! Sua competência
aliada a sua louvável humildade o fazem
um exemplo para muitos! Este trabalho seria impossível
ser realizado sem sua disposição e experiência.
Obrigada por todos os momentos em que me recebeu,
por cada palavra de direcionamento,
por todas as manhãs e tardes de convivência no Biotério.
Meus mais sinceros agradecimentos!*

*À Professora Dra. Suely Regina Mogami Bomfim,
pela contribuição importantíssima para a realização deste trabalho.*

*Certamente que sua esmera personalidade detalhista,
competência e profissionalismo foram a chave em que
as portas deste trabalho puderam também ser abertas!*

*Obrigada porque também a considero um exemplo
da difícil tarefa de se unir uma mãe e esposa dedicada
a uma exímia profissional. Vou ser eternamente grata!*

Ao Professor Dr. Tetuo Okamoto,

com quem tive o privilégio de compartilhar este trabalho em uma fase tão importante. Um exemplo de mestre a ser seguido por todos! Obrigada por disponibilizar sua inigualável experiência à execução deste trabalho e pela maneira carinhosa como sempre me recebeu.

À Professora Dra. Roberta Okamoto,

pela contribuição indispensável a este trabalho. Obrigada por ter me recebido de uma forma tão especial, o que faz de você alguém mais do que especial. Certamente sua competência a levará a lugares cada vez mais altos e seu caráter e simpatia a atraírem sempre a admiração de todos. Deixo aqui também meus agradecimentos.

Ao Professor Dr. Robson Frederico Cunha,

com quem tive o privilégio de ser orientada no mestrado e que me ensinou o que é realmente ser um mestre. Seu exemplo de seriedade, competência e caráter serão para mim um exemplo a ser seguido nesta nova fase de minha vida. Obrigada pelo estímulo, por cada sábio conselho e também por sua valiosa amizade.

"A tarefa do educador moderno não é derrubar florestas, mas irrigar desertos."

C. S. Lewis

À minha família em Araçatuba, Sr. Aparecido e Rute Zanon, e Fábio... por cada gesto, cada abraço, cada beijo, cada palavra, que me impulsionaram a continuar e a chegar onde eu estou. Vocês não imaginam o que representam para mim. Amo vocês!

Ao querido amigo Jonatas Caldeira Esteves, do mestrado em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, pela amizade, apoio, pela maneira tão indispensável em auxiliar-me quando precisei ausentar-me de Araçatuba. Jamais vou esquecer o que fez por mim.

Aos queridos amigos do Laboratório de Farmacologia, Isabelle Rodrigues Freire, doutoranda em Odontopediatria, e Daniel Galera Bernabé, doutorando em Estomatologia, pela companhia tão agradável, por terem se tornados irmãos para mim. Vou levar vocês no meu coração onde eu estiver.

Ao querido aluno de Iniciação Científica, Renato Colenci, pela valiosa contribuição a este trabalho, sem dúvida um aluno de excelência que galgará lugares muito altos. Alguém com quem aprendi muito e admiro muito pelo seu caráter e maturidade. Obrigada Batatinha!!!

À querida Marcelle Danelon, do mestrado em Odontopediatria, com quem tive a felicidade de conhecer e tornar-me amiga nos últimos momentos do curso.

Às minhas eternas amigas-irmãs, Mariana Machado e Rosana Leal do Prado, que a distância impossibilita de apagar uma amizade tão profunda. Sinto muitas saudades.

“A melhor parte da vida de uma pessoa está nas suas amizades.”

Abraham Lincoln

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba, na pessoa dos professores Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé, digníssimo Diretor e Dra. Ana Maria Pires Soubhia, digníssima Vice-Diretora.

Ao Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba –UNESP, na pessoa de seu coordenador Prof. Dr. Robson Frederico Cunha.

Aos professores do Departamento de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem, Dra. Rosângela dos Santos Nery e Dra. Sandra M. H. C. Ávila de Aguiar, exemplos de dedicação, pela agradável convivência e conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários da Disciplina de Odontopediatria, Mário, Maria e Berta, pelo auxílio indispensável e momentos de descontração.

À todos os colegas do curso de Pós-Graduação em Odontopediatria (Mestrado e Doutorado) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela convivência carinhosa.

Aos meus colegas e amigos de turma Márcio, Ana Carolina, Karina Mirela, Karine e Karina Bianco pelas trocas de conhecimentos e amizade.

Aos professores do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, em especial Dra. Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune, Dra. Cristina Antoniali Silva e Dr. João

Cesar Bedran de Castro pela convivência e conhecimentos transmitidos. E a Lourdes, do Departamento de Ciências Básicas, pela convivência e solicitude.

Aos meus queridos amigos e colegas do Laboratório de Farmacologia, Isabelle, Daniel, Renato, Vanessa, Adriano, Leonardo, Rafaela, Caroline e Amanda, e a técnica Elisa, pelos momentos inesquecíveis de alegria e labutas no laboratório.

Ao Sr. Camilo, João, Alan e Odair pela solícita e indispensável contribuição a este trabalho com o trato dos animais. Em especial, ao "Dadá" que possui o dom de Deus de transformar momentos de tensão em alegria.

Aos professores do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, Dr. Roberto Holland pelos momentos inesquecíveis de aprendizado e Dr. Valdir de Souza. Ao professor Dr. João Eduardo Gomes Filho pela gentileza em nos conceder a utilização do laboratório de Endodontia.

Ao professor Dr. Eloi Dezan Junior pela realização da estatística deste trabalho. Sua contribuição final para este trabalho foi indispensável. Deixo aqui meu profundo agradecimento. À querida amiga do Doutorado em Odontopediatria, Simone Watanabe, pelo carinho, amizade e por nos auxiliar com as fotografias.

Às técnicas do Laboratório de Endodontia, Hermelinda, Nelci e Neusa, pelo auxílio e agradável convivência. Em especial, deixo meus sinceros agradecimentos a "Herme" pelo corte das peças e também por ter sido uma mãe para mim, compartilhando e me ajudando em momentos de dificuldades e a "Néo" pela coloração das peças e pela alegria com quem sempre me recebeu.

A Noemia, do Departamento de Odontologia Restauradora, pelas orações, exemplo de fé e convivência tão especial. E também a querida Antônia, do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, pelas conversas tão edificantes e pela forma maternal como sempre me recebia.

Aos Professores do Depto de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, Dra. Sônia Regina Panzarini Barioni, por sempre me receber de uma forma tão carinhosa e pela valiosa contribuição com a análise de histomorfometria e ao Dr. Michel Saad Neto, com quem tive o privilégio de conviver e aprender muito na área de Traumatologia Dentária.

Aos técnicos do Laboratório de Cirurgia, Gilmar, Bernadete e Dirce pela atenção e gentileza. Em especial a Dirce pela coloração das peças. A aluna de Iniciação Científica, Paulinha pelo auxílio nos ensaios de Imuno histoquímica.

Aos professores do Curso de Veterinária da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, Dr. Wagner Luís Ferreira pela prontidão no atendimento dos animais, Dra. Valéria Marçal Félix de Lima, Dra. Valéria Nobre Leal de Souza Oliva e Dr. Paulo Sérgio Patto dos Santos, pelas contribuições na metodologia deste trabalho. Em especial ao professor titular e Dr. Wilson Machado de Souza e sua esposa, Sra. Nair, por me transmitirem experiências profissionais e de vida.

À Dra. Marjorie de Assis Golim, do Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Botucatu, UNESP, pela análise dos ensaios de citometria.

À professora Dra. Elenice Deffune, do Departamento de Urologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, pela valiosa e indispensável contribuição com a metodologia deste trabalho e na forma tão carinhosa

que nos recebeu em seu departamento. Ao aluno de pós-graduação, Andrei Moroz da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, pela contribuição com a metodologia deste trabalho.

À Marina, Diogo e Valéria, da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP, pelo profissionalismo e atenção sempre carinhosa.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da UNESP, Ana Cláudia, Luzia, Ivone, Cláudio, Maria Cláudia, Izamar, Marina, Alexandra e Jéssica pela atenção e afeto que nos recebem. Em especial à Ana Cláudia pela revisão deste trabalho e à Ivone, que mesmo eu estando distante, me atendeu junto ao COMUT de forma tão solícita.

Aos professores da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará (UFPA), Armando Brito Chermont e Dr. Antônio José da Silva Nogueira pelo apoio indescritível nesta fase.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) que possibilitou a realização deste Curso de Doutorado e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de recursos.

Aos animais que sublimaram a própria vida por um bem maior...

À todos aqueles que, de certa forma, contribuíram para a elaboração e conclusão deste trabalho, Minha eterna gratidão...

“Posso esquecer do rosto de alguém e do que ele me falou, mas não esquecerei do que este alguém me fez sentir” Pasini

Epígrafe

"Cada escolha cria ondulações ao longo do tempo e dos relacionamentos, ricocheteando em outras escolhas. E, a partir do que parece uma confusão enorme, Papai tece uma tapeçaria magnífica. Só Papai pode resolver isso e Ele o faz com graça."

Trecho do livro "A Cabana", Willian P. Young

ASSUNÇÃO, L. R. S. Resposta tecidual de dentes reimplantados utilizando plasma pobre em plaquetas, plasma rico em plaquetas e células-tronco da medula óssea. Estudo em cães. 2009. 248 f. Tese (Doutorado)– Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2009.

RESUMO

A avulsão dentária é um tipo de trauma que resulta na perda da continuidade de um complexo e múltiplo compartimento de tecidos. Componentes derivados do sangue, incluindo o plasma pobre em plaquetas (PPP) e o plasma rico em plaquetas (PRP) constituem uma opção terapêutica para o reparo tecidual. O gel de PRP tem sido usado como arcabouço para células-tronco da medula óssea em Engenharia Tecidual. O propósito da presente investigação foi avaliar o efeito do PPP, PRP ativado ou não por trombina e células-tronco (CT) originárias da medula óssea associadas ao PRP no reparo de reimplantes dentários. Quatro cães foram utilizados neste estudo. PRP e PPP foram obtidos pelo método de dupla centrifugação a partir do sangue coletado da veia jugular dos animais. CT foram obtidas por aspiração da medula óssea (AMO) e isoladas pelo método de centrifugação por densidade de gradiente. A citometria de fluxo (CF) foi realizada após AMO utilizando marcadores celulares CD34 e CD90. Após 30 minutos da extração, os dentes foram reimplantados e, de acordo com a proposta metodológica, divididos em 5 grupos: Grupo I – dentes reimplantados sem material (Controle); Grupo II – dentes reimplantados com o Plasma Pobre em Plaquetas (PPP); Grupo III – dentes reimplantados com o Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio (PRP); Grupo IV – dentes reimplantados com o Plasma Rico em Plaquetas ativado por trombina de origem bovina e cloreto de cálcio (PRP + TR) e Grupo V – dentes

reimplantados com células-tronco da medula óssea associadas ao PRP ativado por cloreto de cálcio (CT + PRP). Análises histológica, histomorfométrica e imunohistoquímica foram realizadas 120 dias após o reimplante. Análise de variância (ANOVA) e o teste *post-hoc* de Tukey foram utilizados para a análise estatística, com nível de significância de 5%. CF mostrou 55,98% de CD34+ e 33,28% de CD90+ após AMO. O grupo V (CT + PRP) apresentou as maiores áreas de reabsorção por substituição, confirmado por intensa imunomarcção para osteopontina, com diferença estatisticamente significativa, durante a análise histomorfométrica, quando comparado aos demais grupos, exceto com o Grupo I (Controle). O grupo III (PRP) também apresentou áreas de reabsorção por substituição, porém com menos evidência do que o grupo V. Os Grupos II e IV obtiveram os melhores resultados, sendo que o Grupo IV (PRP + TR) não apresentou evidências de reabsorção por substituição. Por outro lado, o Grupo II (PPP) mostrou áreas de reabsorção inflamatória, com imunomarcção positiva mais intensa para a fosfatase ácido tartarato resistente (TRAP) em alguns espécimes. Os achados deste estudo experimental sugerem que o uso da trombina no preparo do PRP desempenha um importante papel na regeneração dos tecidos após reimplante dentário.

Palavras-chave: Reimplante dentário. Plasma Rico em Plaquetas. Células-tronco.

Medula óssea.

ASSUNÇÃO, L. R. S. Tissue response of replanted teeth using platelet-poor plasma, platelet-rich plasma and bone marrow stem cells. Study in dogs. 2009. 248 f. Thesis (Doctorate)– São Paulo State University, Araçatuba, 2009.

Abstract

Dental avulsion constitutes a traumatism which results in the loss of a complex and multiple tissue compartments. Blood-components products, including platelet-poor plasma (PPP) and platelet-rich plasma (PRP), constitute a therapeutic option for tissue healing. PRP gel has also been used as a scaffold for bone marrow stem cells in Tissue Engineering. This study aimed to evaluate the effect of PPP, PRP activated or not with thrombin and bone marrow stem cells (BMSC) associated with PRP on the healing of replanted teeth. Four adult hybrid dogs were used in this study. PRP and PPP were obtained through double centrifugation technique of blood collected from the jugular vein of the animals. CTM were obtained from bone marrow aspiration (BMA) and isolated by density gradient centrifugation method. Flow Cytometry Analysis (FCA) was performed after BMA using CD34 and CD90 cells markers. After 30 minutes of extraction, teeth were replanted and, according to the methodological proposal, divided into 5 Groups: Group I – teeth replanted without any material (Control); Group II – teeth replanted with Platelet-poor Plasma (PPP); Group III – teeth replanted with Platelet-rich plasma activated by sodium chloride (PRP); Group IV – teeth replanted with Platelet-rich plasma activated by bovine thrombin and sodium chloride (PRP + TR) and Group V – teeth replanted with bone marrow stem cells associated with PRP activated by sodium chloride (BMSC + PRP). Histological,

histomorphometric and immunohistochemical analysis were assessed 120 days after reimplantation. Analysis of variance (ANOVA) and Tukey *post-hoc* test were used for the statistical analysis, with the level of significance set at 5%. FCA showed 55.98% of CD34+ and 33.28% of CD90+ after BMA. Group V (BMSC + PRP) presented the largest areas of replacement resorption, confirmed by intense immunomarcation for osteopontin, with a significant difference during the histomorphometric analysis when compared to the other groups, except to Group I (Control). The Groups II and IV yielded better results, where Group IV (PRP + TR) presented no evidence of replacement resorption. On the other hand, Group II (PPP) showed areas of inflammatory resorption, with a more intense positive immunomarcation for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP). The findings of this experimental study suggest that the use of thrombin in PRP preparation play an important role in the regeneration of tissues after tooth reimplantation.

Keywords: Tooth reimplantation. Platelet-rich plasma. Stem cells. Bone marrow.

Lista de Figuras

FIGURA 1-	Abertura de um incisivo intermédio superior.	83
FIGURA 2-	Aspecto de um pré-molar após a abertura coronária.	83
FIGURA 3-	Preparo biomecânico do canal radicular.	84
FIGURA 4-	Obturação do canal radicular.	84
FIGURA 5-	Sindesmotomia do elemento dentário.	85
FIGURA 6-	Odontossecção do 1º pré-molar inferior esquerdo.	86
FIGURA 7-	Fixação dos elementos dentários após extração.	86
FIGURA 8-	Contenção dos incisivos superiores e inferiores.	87
FIGURA 9-	Aspecto de um 2º pré-molar após a contenção.	87
FIGURA 10-	Separação das duas frações do sangue após a 1ª centrifugação.	90
FIGURA 11-	Obtenção do Plasma Pobre e Plaquetas (PPP) e Plasma Rico em Plaquetas após a 2ª centrifugação.	90
FIGURA 12-	Plasma pobre em plaquetas acondicionado em recipiente de plástico esterilizado.	90
FIGURA 13-	Plasma rico em plaquetas acondicionado em recipiente de plástico esterilizado.	92
FIGURA 14-	Plasma rico em plaquetas colocado no interior do alvéolo.	92
FIGURA 15-	Reimplante do elemento dentário.	92
FIGURA 16-	Diagrama e foto ilustrando a punção ilíaca realizada para obtenção das Células-tronco mononucleares da medula óssea.	94
FIGURA 17-	Separação das células por centrifugação utilizando Ficoll-Paque™. A seta indica a camada das células mononucleares (células-tronco).	96
FIGURA 18-	<i>Pellet</i> de células formado após a última centrifugação (seta).	96
FIGURA 19-	Contagem de células utilizando a câmara de Neubauer através da exclusão pelo teste de vitalidade com azul de Tripiano (seta).	97

FIGURA 20-	Citômetro de fluxo utilizado para a análise de caracterização das células da medula óssea.	98
FIGURA 21-	Área total radicular selecionada para quantificação.	101
FIGURA 22-	Planilha contendo os valores referentes à área e a porcentagem.	101
FIGURA 23-	Área de reabsorção de superfície selecionada para quantificação.	102
FIGURA 24-	Área de reabsorção por substituição selecionada para quantificação.	102
FIGURA 25-	Área de reabsorção inflamatória selecionada para quantificação (esquerda) e área total radicular selecionada (direita).	103
FIGURA 26-	Grupo I (Controle). Camada de cimento secundário (CS) sobre dentina e cimento íntegros. H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina.	107
FIGURA 27-	Grupo I (Controle). Área de reabsorção de superfície com tecido cementário neoformado (1). H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina.	107
FIGURA 28-	Grupo I (Controle). Ligamento periodontal (LP) com feixes de fibras colágenas e áreas com discretas formações ósseas. Tricrômio de Masson, original 63X. OA=Osso Alveolar; d=dentina.	108
FIGURA 29-	Grupo I (Controle). Ligamento periodontal (LP) relativamente organizado. H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; d=dentina.	108
FIGURA 30-	Grupo I (Controle). Áreas de dentina e cimento (1) reabsorvida com a presença de tecido conjuntivo (TC) pouco vascularizado. H.E., original 63X. d=dentina.	109
FIGURA 31-	Grupo I (Controle). Parede óssea praticamente em contato com dentina ou cimento (1). H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; d=dentina.	110
FIGURA 32-	Grupo I (Controle). Extensas áreas de reabsorção por substituição com formação de tecido ósseo (TO). H.E., original 25X. OA=Osso Alveolar; d=dentina.	110
FIGURA 33-	Grupo I (Controle). Áreas de reabsorção cimento-dentinária (RCD) e pequenas áreas com cimento íntegro (CE). H.E., original 25X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina.	111

- FIGURA 34- Grupo II (Plasma Pobre em Plaquetas). Discretas áreas de reabsorção de superfície ocupada por cimento secundário (CS). H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina. 112
- FIGURA 35- Grupo II (Plasma Pobre em Plaquetas). Cimento mostrando-se íntegro, com pequenas áreas de reabsorção de superfície (1). H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina. 112
- FIGURA 36- Grupo II (Plasma Pobre em Plaquetas). Presença de fibras colágenas (1) com discreta neoformação óssea. Tricrômio de Masson, original, 63X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina. 113
- FIGURA 37- Grupo II (Plasma Pobre em Plaquetas). Espessa camada de cimento secundário (CS) sobre a superfície radicular. H.E., original 63X. d=dentina. 114
- FIGURA 38- Grupo II (Plasma Pobre em Plaquetas). Tecido ósseo neoformado ocupando o espaço do Ligamento Periodontal (1). H.E., original 25X. OA=Osso Alveolar; d=dentina. 114
- FIGURA 39- Grupo II (Plasma Pobre em Plaquetas). Extensas áreas de reabsorção cimento-dentinária (1) ocupada por tecido conjuntivo (TC). H.E., original 63X. d=dentina. 115
- FIGURA 40- Grupo II (Plasma Pobre em Plaqueta). Áreas de reabsorção (1) ocupada por tecido conjuntivo (TC). H.E., original 63X. LP=Ligamento Periodontal; d=dentina. 116
- FIGURA 41- Grupo II (Plasma Pobre em Plaqueta). Área com extensa reabsorção inflamatória (RI) com conseqüente destruição da superfície dentinária. H.E., original 63X. d=dentina. 116
- FIGURA 42- Grupo III (Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio). Estreitamento do espaço do ligamento periodontal (LP), ocasionado pelo cimento (C) e/ou tecido ósseo (TO) neoformados. H.E., original 63X. d=dentina. 117

- FIGURA 43- Grupo III (Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio). 118
Estreitamento do espaço do ligamento periodontal (LP), ocasionado pelo cimento (CE) e/ou tecido ósseo (TO). H.E., original 63X. d=dentina.
- FIGURA 44- Grupo III (Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio). 118
Ligamento periodontal (LP) exibindo moderado número de fibroblastos. H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; d=dentina.
- FIGURA 45- Grupo III (Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio). 119
Ligamento periodontal (LP) com moderado número de fibroblasto. Área de reabsorção de superfície com reparo (1). H.E., original 63X. d=dentina.
- FIGURA 46- Grupo III (Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio). 120
Espaço do ligamento periodontal preenchido com tecido ósseo neoformado (TON). H.E., original 63X. d=dentina.
- FIGURA 47- Grupo III (Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio). 120
Espaço do ligamento periodontal preenchido com tecido ósseo neoformado (TON), com ausência de cimento. H.E., original 63X. d=dentina.
- FIGURA 48- Grupo III (Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio). 121
Espaço do ligamento periodontal preenchido com tecido conjuntivo (TC) pouco vascularizado. H.E., original 63X. d=dentina.
- FIGURA 49- Grupo IV (Plasma Rico em Plaquetas ativado por trombina bovina e cloreto de cálcio). 122
Discreta reabsorção cimento dentinária (RCD) ocupada por tecido conjuntivo com discretos números de fibroblastos. H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina.
- FIGURA 50- Grupo IV (Plasma Rico em Plaquetas ativado por trombina bovina e cloreto de cálcio). 123
Estreitamento do ligamento periodontal (LP) ocasionado por cimento (CE) e tecido ósseo (TO). H.E., original 63X. d=dentina.
- FIGURA 51- Grupo IV (Plasma Rico em Plaquetas ativado por trombina bovina e cloreto de cálcio). 123
Estreitamento do ligamento periodontal (LP) ocasionado por cimento (CE) e tecido ósseo (TO). H.E., original 63X. d=dentina.

- FIGURA 52- Grupo IV (Plasma Rico em Plaquetas ativado por trombina bovina e cloreto de cálcio). Estreitamento do ligamento periodontal (LP) ocasionado pela formação de cimento secundário (CS). H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; d=dentina. 124
- FIGURA 53- Grupo IV (Plasma Rico em Plaquetas ativado por trombina bovina e cloreto de cálcio). Discreta reabsorção de superfície (1) ocupada por cimento secundário (CS). H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina. 125
- FIGURA 54- Grupo IV (Plasma Rico em Plaquetas ativado por trombina bovina e cloreto de cálcio). Moderada faixa de cimento secundário (CS) sobre o cimento original com integridade. H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina. 126
- FIGURA 55- Grupo IV (Plasma Rico em Plaquetas ativado por trombina bovina e cloreto de cálcio). Espaço do ligamento periodontal (LP) mostrando feixes de fibras colágenas dispostas obliquamente. Tricrômio de Masson, original 63X. OA=Osso Alveolar; d=dentina. 127
- FIGURA 56- Grupo IV (Plasma Rico em Plaquetas ativado por trombina bovina e cloreto de cálcio). Espaço do ligamento periodontal (LP) mostrando feixes de fibras colágenas mais irregulares. Tricrômio de Masson, original 63X. OA=Osso Alveolar; d=dentina. 127
- FIGURA 57- Grupo V (Células-Tronco e Plasma Rico em Plaquetas). Reabsorção por substituição: espaços do ligamento periodontal praticamente ocupado por tecido ósseo neoformado (TON). H.E., original 63X. d=dentina. 128
- FIGURA 58- Grupo V (Células-Tronco e Plasma Rico em Plaquetas). Reabsorção inflamatória com extensas áreas de reabsorção cimento-dentinária (RCD). H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; d=dentina. 129
- FIGURA 59- Grupo V (Células-Tronco e Plasma Rico em Plaquetas). Espaço do ligamento periodontal ocupado por tecido ósseo neoformado (TON). H.E., original 63X. d=dentina. 129
- FIGURA 60- Grupo V (Células-Tronco e Plasma Rico em Plaqueta). Superfície cementária parcialmente ocupada por tecido ósseo (1). Áreas de cimento e dentina reabsorvidas (2). H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina. 130

- FIGURA 61- Grupo V (Células-Tronco e Plasma Rico em Plaquetas). Espaço do ligamento periodontal (LP) irregular ocupado por tecido conjuntivo com discreto número de fibroblastos. H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; d=dentina. 131
- FIGURA 62- Grupo V (Células-Tronco e Plasma Rico em Plaquetas). Áreas inativas de reabsorção de superfície (1). H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina. 132
- FIGURA 63- Grupo V (Células-Tronco e Plasma Rico em Plaquetas). Presença de cimento secundário (CS) sobre a superfície do cimento pré-existente. H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina. 132
- FIGURA 64- Grupo I (Controle). Imunomarcações positivas para células osteoblásticas no Ligamento Periodontal (setas). Aumento de 40X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina. 133
- FIGURA 65- Grupo I (Controle). Imunomarcações positivas para células osteoclásticas na região de osso alveolar (seta). Aumento de 40X. OA=Osso Alveolar. 134
- FIGURA 66- Grupo II (Plasma Pobre em Plaquetas). Ligamento periodontal com imunomarcações para a linhagem clástica (setas). Aumento de 40X. OA=Osso Alveolar. 135
- FIGURA 67- Grupo II (Plasma Pobre em Plaquetas). Imunomarcações positivas para a linhagem clástica na região de osso alveolar (seta). Aumento de 40X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina. 136
- FIGURA 68- Grupo III (Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio). Área de anquilose com imunomarcação intensa para a osteopontina na linhagem osteoblástica (setas). Aumento de 10X. OA=Osso Alveolar; d=dentina. 137
- FIGURA 69- Grupo III (Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio). Espécime com imunomarcações positivas para linhagem clástica no osso alveolar (setas). Aumento de 40X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal. 138

- FIGURA 70- Grupo IV (Plasma Rico em Plaquetas ativado por trombina bovina e cloreto de cálcio). Área de cimento e ligamento periodontal com intensa marcação para a osteopontina (setas). Aumento de 40X. LP=Ligamento Periodontal; d=dentina. 139
- FIGURA 71- Grupo IV (Plasma Rico em Plaquetas ativado por trombina bovina e cloreto de cálcio). Imunomarcações discretas para a linhagem de células clásticas (seta). Aumento de 40X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina. 140
- FIGURA 72- Grupo V (Células-tronco e Plasma Rico em Plaquetas). Área de anquilose com marcação positiva para a osteopontina (seta). Aumento de 40X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina. 141
- FIGURA 73- Grupo V (Células-tronco e Plasma Rico em Plaquetas). Imunomarcações intensas para a linhagem de células clásticas em região da superfície radicular e no osso alveolar (setas). Aumento de 40X. OA=Osso Alveolar; d=dentina. 142
- FIGURA 74- Citometria de fluxo realizada após punção ilíaca com adição de anti- CD34. 143
- FIGURA 75- Citometria de fluxo realizada após punção ilíaca com adição apenas de anticorpo secundário (controle) (esq.) e com adição de anticorpo anti-CD90 (dir.). 144
- FIGURA 76- Comprometimento radicular quanto à ocorrência de reabsorção de superfície em valores relativos * estatisticamente significativa ($p < 0,05$). 146
- FIGURA 77- Comprometimento radicular quanto à ocorrência de reabsorção por substituição em valores relativos * estatisticamente significativa ($p < 0,05$). 148
- FIGURA 78- Comprometimento radicular quanto à ocorrência de reabsorção inflamatória em valores relativos. 150

Lista de Tabelas

TABELA 1-	Distribuição do material utilizado entre os cães	86
TABELA 2-	Teste de Tukey para comparações individuais entre os cinco grupos quanto à reabsorção de superfície	147
TABELA 3-	Teste de Tukey para comparações individuais entre os cinco grupos quanto à reabsorção por substituição	149
TABELA 4-	Teste de Tukey para comparações individuais entre os cinco grupos quanto à imunomarcação pelo anticorpo anti-TRAP	151

Lista de Abreviaturas

ACD-A	Ácido cítrico, citrato de sódio, dextrose adenina
ANOVA	Análise de variância
A.T.	Área total
BMMSCs	Células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea
BMP	Proteína morfogenética do osso
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CE	Cemento
CS	Cemento secundário
CT	Células-tronco
DMEM	Meio de Dulbecco´s modificado por Eagle
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EGF	Fator de crescimento epidermal
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FGF-b	Fator de crescimento de fibroblasto básico
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
G	Gravidade
g	Grama (s)
H.E.	Hematoxilina e eosina
HSCs	Células-tronco hematopoiéticas
IGF-I	Fator de crescimento similar à insulina
IgG	Imunoglobulina G
Kg	Quilograma (s)
LP	Ligamento Periodontal
mg	Miligrama (s)
ml	Mililitro (s)
mm	Milímetro (s)
mm ²	Milímetro (s) quadrado (s)
nº	Número
ns	Não significante estatisticamente

μL	Microlitro (s)
°C	Graus Celsius
p	Nível de significância estatística
PBS	Tampão fosfato citrato
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	Potencial hidrogeniônico
PPP	Plasma Pobre em Plaquetas
PRF	Plasma Rico em Fibrinogênio
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
PRP + TR	Plasma Rico em Plaquetas ativado por trombina bovina e cloreto de cálcio
PVP-I	Polivinilpirrolidona iodada
RCD	Reabsorção cimento-dentinária
Reab. Infl.	Reabsorção inflamatória
Reab. Subs.	Reabsorção por substituição
Reab. Sup.	Reabsorção de superfície
RI	Reabsorção inflamatória
RPE	Ficoeritina-R
rpm	Rotações por minuto
TC	Tecido conjuntivo
TGF-β	Fator de crescimento de transformação beta
TO	Tecido ósseo
TON	Tecido ósseo neoformado
TRAP	Fosfatase ácido tartarato resistente
Thy-1	Antígeno 1 de diferenciação do timócito
U	Unidades
V. Absol.	Valor absoluto
V. Rel.	Valor relativo
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

Sumário

1 Introdução	40
2 Revisão da Literatura	45
2.1 Avulsão e Reimplante dentário	45
2.2 Componentes do sangue: Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) e Plasma Rico em Plaquetas (PRP)	56
2.3 A Inovação: Terapia Celular e Engenharia Tecidual	68
3 Proposição	78
4 Material e Método	80
4.1 Animais	80
4.2 Tratamento endodôntico	81
4.3 Reimplante dentário	84
4.3.1 Grupo I: Reimplante sem material (Controle)	88
4.3.2 Grupo II: Reimplante com Plasma Pobre em Plaquetas (PPP)	88
4.3.2.1 <i>Preparo do Plasma Pobre em Plaquetas</i>	88
4.3.3 Grupo III: Reimplante com Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio (PRP)	91
4.3.3.1 <i>Preparo do Plasma Rico em Plaquetas</i>	91
4.3.4 Grupo IV: Reimplante com Plasma Rico em Plaquetas ativado por trombina de origem bovina e cloreto de cálcio (PRP + TR)	93
4.3.5 Grupo V: Reimplante com células-tronco associadas ao Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio (CT + PRP)	93
4.3.5.1 <i>Coleta do material da medula óssea</i>	93
4.3.5.2 <i>Separação das células-tronco derivadas da medula óssea de cão</i>	95
4.3.5.3 <i>Caracterização celular através de citometria de fluxo</i>	97
4.4. Cuidados pós-operatórios	98
4.5 Análise histomorfológica e histomorfométrica	99
4.6 Análise de Imuno Histoquímica	103
4.7 Análise estatística	104
5 Resultado	106
5.1 Análise Histomorfológica	106

5.2 Análise de Imuno Histoquímica	133
5.3 Caracterização celular por citometria de fluxo	142
5.4 Análise Estatística	144
5.4.1 Análise Histomorfométrica	144
5.4.2 Análise de Imuno Histoquímica	150
6 Discussão	153
7 Conclusão	177
Referências	180
Anexos	206

1 Introdução

a avulsão é um tipo de traumatismo que resulta na perda de continuidade das estruturas responsáveis pela manutenção da integridade e conservação do elemento dentário no osso alveolar, abrangendo um complexo e múltiplo compartimento de tecidos. Este tipo de injúria envolve o rompimento do epitélio gengival, ruptura do ligamento periodontal, danos ao cimento e osso alveolar e comprometimento do sistema neurovascular da polpa (BARRET; KENNY, 1997). Por esse motivo, o manejo de dentes avulsionados consiste em um desafio para clínicos e objeto de estudos por pesquisadores há décadas.

A fim de se evitar a perda do elemento dentário com conseqüências estéticas e funcionais desfavoráveis para o paciente, o reimplante tem sido uma manobra terapêutica recomendada após a avulsão de dentes permanentes (ALEXANDER, 1956). Entretanto, o prognóstico de dentes reimplantados está na dependência de diversos fatores os quais incluem o tempo extra-alveolar do dente avulsionado (ANDREASEN, 1981b; SÖDER et al., 1977), o meio de armazenamento (ANDREASEN, 1980c; BLOMLÖF et al., 1980; MATSSON et al., 1982) e o grau de desenvolvimento radicular (KRISTERSON; ANDREASEN, 1984).

Segundo Andreasen e Andreasen (2001), a patologia do reimplante dentário pode ser dividida em reação pulpar e periodontal. A reação do ligamento periodontal diante da avulsão e reimplante inclui o reparo com ligamento periodontal normal,

reparo com reabsorção de superfície, reparo com reabsorção por substituição e reparo com reabsorção inflamatória. A ocorrência das reabsorções está diretamente relacionada à preservação ou não da vitalidade das células do ligamento periodontal (LINDSKOG et al., 1985).

Um reparo com ligamento periodontal normal é uma situação difícil de ocorrer na prática clínica, já que o traumatismo resultará em pelo menos uma lesão mínima à camada mais interna do ligamento (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001). Vários autores preconizam o uso de substâncias para o tratamento alveolar e radicular antes do reimplante (BARRET et al., 2005; BUTCHER; VIDAIR, 1955; LINDSKOG et al., 1983; NORDENRAM et al., 1973, SHULMAN et al., 1973; ZANETTA-BARBOSA; CARVALHO, 1990), porém com resultados não satisfatórios ou inconclusivos. O objetivo almejado é a completa reinserção do dente avulsionado com estruturas e funções restabelecidas.

A reinserção dos tecidos de conexão à superfície radicular após a avulsão depende de eventos de cicatrização que ocorrem de forma seqüencial. Um coágulo é formado entre as duas partes do ligamento periodontal rompido e, durante o processo de coagulação o fibrinogênio é convertido em fibrina. A fibrina desempenha um importante papel na cicatrização da ferida por sua capacidade de se unir à fibronectina, e provocar a migração de fibroblastos e a angiogênese (DVORAK et al., 1987). Derivados do sangue incluindo plasma liofilizado e fibronectina foram utilizados com resultados satisfatórios em reimplantes experimentais (NASJLETI et al., 1986, 1987a, 1987b).

Outro constituinte do sangue que tem sido utilizado com resultados promissores na Odontologia é o Plasma Rico em Plaquetas (PRP). O PRP é uma mistura de fatores de crescimento e cola modificada de fibrina autógena (MARX et al., 1998) com potencial regenerador, em especial de tecido ósseo (GONSHOR, 2002). Recentemente, este material tem sido relatado na regeneração de outros tipos de tecidos como a cartilagem (NAGAE et al., 2007), tendões (KON et al., 2009), mucosa oral (LINDEBOOM et al., 2007) e tecidos periodontais (TÖZUM et al., 2006). Outra fração importante nos processos de regeneração e reparação é o Plasma Pobre em Plaquetas (PPP), porém igualmente importante por ser rico em fibrinogênio (CHAGAS et al., 2004).

A busca da excelência da regeneração tem sido alvo de um campo novo e promissor denominado Engenharia Tecidual (BIANCO; ROBEY, 2001). O mecanismo da engenharia tecidual é estruturado sobre uma tríade composta de células, fatores de crescimento e um arcabouço (SLAVKIN; BARTOLD, 2006). As células-tronco mesenquimais, ou seja, células com capacidade de gerar outros tecidos, como osso, cartilagem, músculo, tendão e tecidos de conexão, tem sido o alvo de pesquisas nessa área (RISBUD; SHAPIRO, 2005). A medula óssea, além de ser o maior reservatório de células-tronco hematopoiéticas, os quais renovam continuamente os elementos sanguíneos circulantes, apresenta também células-tronco mesenquimais (PITTENGER et al., 1999).

Também neste contexto, muitos estudos têm relatado resultados promissores na utilização do gel de PRP como arcabouço (*scaffold*) para células mesenquimais indiferenciadas em estudos *in vitro* (LIN et al., 2006) e *in situ* (YAMADA et al.,

2004), pois, além de servirem como matriz, é um composto indiscutivelmente rico em fatores de crescimento (MARX, 2001), compondo, dessa maneira, o tripé da Engenharia Tecidual.

A avulsão dentária é considerada um traumatismo severo no qual as estruturas de suporte e de vascularização são altamente comprometidas. Diante da temática duvidosa quanto ao prognóstico de dentes reimplantados e em face dos bons resultados na utilização de produtos biológicos com potencial regenerador em tecidos lesados por doenças ou traumas, justifica-se a realização do presente estudo.

2 Revisão da Literatura

2.1 AVULSÃO E REIMPLANTE DENTÁRIO

Segundo a Organização Mundial de Saúde, os traumatismos dentários são categorizados como problema de saúde pública (ANDREASEN; ANDREASEN, 2002), sendo comum sua ocorrência entre crianças e adolescentes, com um aumento marcante em sua incidência entre as idades de 8 a 10 anos (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001).

A avulsão ou exarticação é um tipo de injúria traumática que implica um total deslocamento do dente para fora do seu alvéolo, resultando em danos ao feixe neurovascular e ao ligamento periodontal, assim como ao osso alveolar, cemento e tecidos gengivais (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001). Em casos de avulsão, o único tratamento não protético é o reimplante, que consiste na manobra cirúrgica de recolocar no seu próprio alvéolo o dente que foi removido acidental ou intencionalmente (MARZOLLA; CAMPANELLA JUNIOR, 1983). O objetivo deste tratamento é possibilitar a manutenção das relações dente a dente e dente a osso alveolar (MORGADO et al., 1992).

Segundo Andreasen (1980c) a reação do periodonto imediatamente após o reimplante consiste na formação do coágulo entre as duas partes do ligamento periodontal rompido. Após 3 a 4 dias, a fenda no ligamento periodontal é substituída por um tecido conjuntivo jovem. Após uma semana, observa-se a adesão do epitélio gengival à junção cimento-esmalte, o que diminui o risco de infecção bacteriana. Após duas semanas, a linha do rompimento periodontal é reparada, podendo ser observadas fibras colágenas estendendo-se da superfície do cimento até o osso alveolar.

Entretanto, o reparo com a formação de um ligamento periodontal normal é uma situação extremamente difícil de acontecer sob condições clínicas, já que o traumatismo resultará em pelo menos uma lesão mínima à camada mais interna do ligamento, podendo levar à reabsorção de superfície, reparo com reabsorção por substituição ou reparo com reabsorção inflamatória (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001).

Todas as situações de respostas dos tecidos periodontais diante do reimplante dependem da preservação ou não da vitalidade das células do ligamento periodontal, o qual está intimamente relacionado ao período extra-alveolar e manipulação do dente avulsionado. Estudos mostram que o período extra-alveolar de até 15 minutos, mesmo que o dente avulsionado esteja condicionado em meio seco, oferece um bom prognóstico ao reimplante, sendo classificado como tratamento imediato (ANDERSSON; BODIN, 1990). Após 15 minutos, as fibras do ligamento periodontal podem estar comprometidas, aumentando o risco das reabsorções radiculares e

influenciando no prognóstico do dente avulsionado (ANDREASEN; KRISTERSON, 1981).

Vários estudos demonstraram que o prognóstico favorável de reparo do ligamento periodontal diminui a medida que se aumenta o período extra-alveolar do dente avulsionado (ANDREASEN, 1980c; ANDREASEN et al., 1995b, MATSSON et al., 1982), especialmente naqueles mantidos em meio seco (ANDREASEN, 1981a, 1981b). Neste último caso, mesmo após períodos extra-alveolares curtos (30 minutos), uma significativa perda da viabilidade celular no remanescente radicular é observada, aumentando o risco de reabsorções radiculares (SÖDER et al., 1977).

A reabsorção radicular de superfície é caracterizada por cavidades na superfície radicular ou encurtamento da região apical, porém com a presença de espaço periodontal e lâmina dura normais (ANDREASEN et al., 1995a), representando áreas localizadas de danos ao ligamento periodontal ou ao cimento e que foram reparadas por células do ligamento periodontal (ANDREASEN, 1980b). Este tipo de reabsorção pode ser diagnosticada através de exames radiográficos após um ano do reimplante (ANDREASEN et al., 1995b). Histologicamente, este tipo de reabsorção pode ser observada após uma semana do procedimento (ANDREASEN, 1980c).

Andreasen (1981b) demonstrou que a reabsorção de superfície é mais comum em dentes avulsionados e armazenados em solução salina, saliva ou água,

independente do período extra-alveolar quando comparado a dentes mantidos em meio seco, onde, neste último caso, reabsorções radiculares mais agressivas são observadas. Andreasen (1980b) observou a presença desta reabsorção nas faces mais convexas da superfície radicular, indicando uma associação das mesmas com danos mecânicos provocados sobre a superfície radicular durante os movimentos de luxação.

Segundo Andreasen (1980a), a reabsorção radicular por substituição representa a fusão do osso alveolar e a superfície dentária. Este tipo de reabsorção ocorre na presença de extensas áreas de superfícies radiculares danificadas, porém sem a presença de contaminação, gerando uma competição pelo reparo por osteoblastos oriundos da medula óssea, resultando em formação óssea no espaço do ligamento periodontal (TRONSTAD, 1988). O diagnóstico clínico deste tipo de reabsorção pode ser observado entre 1 e 2 meses após o reimplante, podendo ser diagnosticada pelo teste de percussão após 1 semana (ANDREASEN et al., 1995b). Radiograficamente é revelada após 8 semanas do reimplante (ANDREASEN, 1975). O pico para a observação deste tipo de reabsorção ocorre após 2 meses do procedimento em estudos histológicos (ANDREASEN, 1980c). Evidências experimentais indicam a importância da presença do ligamento periodontal vital sobre a superfície radicular funcionando como uma barreira para impedir a ocorrência da reabsorção por substituição (ANDREASEN; KRISTERSON, 1981). Conseqüentemente, períodos extra-alveolares mais longos (acima de 30 minutos) aumentam substancialmente a ocorrência desta alterações (MATSSON et al., 1982).

Andreasen (1980a) estudou a ocorrência deste tipo de reabsorção em macacos, onde os incisivos superiores e inferiores foram reimplantados em períodos de 0 e 18 minutos e mantidos em meio seco ou em solução salina, e em período de 120 minutos após a avulsão experimental e mantidos em meio seco. O autor observou que, no grupo de dentes com reimplante imediato ou após 18 minutos, áreas de anquilose foram observadas preferencialmente nas superfícies vestibular e lingual, ou seja, aquelas que apresentam maior convexidade e também na região apical quando comparado à cervical. O autor também observou a existência de dois tipos de reabsorção por substituição: uma caracterizada pela completa mineralização da região do ligamento periodontal observada na região cervical, labial e lingual e um segundo tipo, composta por camadas de osso depositadas sobre a superfície radicular, alternando com áreas de tecido conjuntivo, nas regiões proximais e apicais. O autor relacionou o primeiro tipo à regiões da raiz com ausência de ligamento periodontal vital, enquanto que, no segundo tipo havia a presença de remanescentes do ligamento periodontal em algumas regiões.

Já a reabsorção radicular inflamatória é definida como cavidades de reabsorção no cimento e dentina associada com inflamação do tecido periodontal adjacente (ANDREASEN, 1980b). Também podem ocorrer por toxinas oriundas da polpa infectada que atingem a superfície radicular via túbulos dentinários (HAMMARSTRÖM et al., 1989). Clinicamente, este tipo de reabsorção pode ser diagnosticada após o primeiro mês do reimplante (ANDREASEN et al., 1995b). Histologicamente, a presença deste tipo de reabsorção pode ser notada após uma semana, mostrando um rápido avanço com o passar do tempo (ANDREASEN, 1980c).

Semelhantemente à reabsorção de superfície, a reabsorção inflamatória está relacionada aos locais da raiz que apresentam maior convexidade (ANDREASEN, 1980b). Além disso, estão mais presentes em reimplantes de dentes armazenados em meio seco (ANDREASEN, 1981b). Também Trope e Friedman (1992), analisando três tipos de meios de armazenamento para dentes avulsionados, observaram a reabsorção inflamatória mesmo em dentes com o tratamento endodôntico radicular, provando a relação deste tipo de alteração com a maneira em que o dente é mantido durante o período extra-alveolar.

Em um estudo clínico e radiográfico em 400 dentes reimplantados, Andreasen et al. (1995b) observaram o reparo do ligamento periodontal em 96 dentes (24%). A reabsorção de superfície foi observada em 4,5% dos casos e diagnosticada no primeiro ano após o reimplante. A reabsorção inflamatória, por sua vez, foi encontrada em 30% dos casos e diagnosticada nos 6 primeiros meses. O aparecimento deste tipo de reabsorção em um período mais tardio, em alguns casos, estava relacionada a progressão da anquilose em dentes com tratamento endodôntico inadequado. Já a reabsorção por substituição foi observada em 61% dos dentes reimplantados, evidenciada após um ou dois meses através de alterações clínicas (som metálico durante a percussão ou ausência de mobilidade). Os autores observaram que, de uma forma geral, as reabsorções podem ser diagnosticadas dentro de um ano de acompanhamento.

Medidas adicionais têm sido realizadas com o intuito de inibir a reabsorção radicular através da aplicação de substâncias na superfície radicular do dente

avulsionado previamente ao reimplante. Essas substâncias incluem o fluoreto de sódio (SHULMAN et al., 1973), o ácido hipoclorito (NORDENRAM et al., 1973), solução de trifosfato de adenosina (ATP) (ZANETTA-BARBOSA, PERRI DE CARVALHO, 1990) e mais recentemente, um derivado de proteína de matriz do esmalte (Emdogain) (BARRET et al., 2005; IGBAL; BAAMAS, 2001). Entretanto, os resultados com a utilização dessas substâncias ainda são controversos.

A técnica ideal para a realização do reimplante tem sido alvo de pesquisas com a aplicação de diversos tipos metodologias. Entretanto, alguns fatores já se encontram sedimentados na literatura e incluem cuidados e manobras que podem melhorar o prognóstico de dentes reimplantados. Um deles consiste na cuidadosa remoção do coágulo antes do reimplante, sendo esta uma importante manobra para a diminuição do risco de inflamação causada pela presença de corpos estranhos, além de promover um contato melhor entre o dente e o osso alveolar (OIKARINEN, 1993).

Outro aspecto seria quanto ao período de contenção dos dentes reimplantados. Segundo Nasjlteti et al. (1982), o período ideal de contenção de dentes reimplantados é de 7 dias, sendo que períodos que extrapolam 6 semanas podem comprometer o reparo do ligamento periodontal (NASJLETI et al., 1982; ANDREASEN et al., 1995b). O período de 7 dias para a contenção é suficiente já que, neste período, as fibras gengivais já se encontram aderidas à superfície dentária, provendo um suporte adequado para manter o elemento dentário no alvéolo (ANDREASEN, 1980c). Gabrielli et al. (1984) também verificaram em um estudo com

molares de ratos que a contenção contribuiu para limitar a migração apical do epitélio, reduziu a presença de reabsorção externa e da tábua óssea alveolar, e favoreceu a revascularização pulpar e o reparo do ligamento periodontal.

A administração de antibióticos após o reimplante é um aspecto importante a ser considerado para a diminuição do risco de reabsorção inflamatória (HAMMARSTRÖM et al., 1989). Entretanto, essa administração quando realizada após 3 semanas do reimplante não mostrou ter efeito sobre a redução deste tipo de reabsorção (HAMMARSTRÖM et al., 1986).

Como foi demonstrado até agora, a realização de procedimentos com o intuito de preservar o máximo possível de células vitais no ligamento periodontal em dentes avulsionados tem sido a preocupação dos pesquisadores e alvo dos estudos durante décadas. Em um estudo realizado por Karring et al. (1993), onde se verificou o restabelecimento dos tecidos de conexão nas superfícies de raízes radiculares privadas de sua conexão periodontal normal, observaram que as células do ligamento periodontal possuem a capacidade de gerar a reinserção do tecido periodontal, ao passo que o osso alveolar e o tecido de conexão gengival não possuem essa propriedade.

No processo de reparo com a formação de um ligamento periodontal normal após o reimplante, a primeira estrutura formada entre a interface dente-osso alveolar é o coágulo (ANDREASEN, ANDREASEN, 2001). A adesão do coágulo à superfície radicular parece ser importante na cicatrização do ligamento periodontal. Em um

estudo de Wikesjö et al. (1991), onde os autores empregaram a utilização de heparina sobre raízes dentárias após a realização de defeitos periodontais em cães, foi observado o comprometimento do reparo dos tecidos de conexão neste grupo, através do menor reparo por tecido conjuntivo e do aumento no crescimento da bolsa epitelial na porção inferior.

Polson e Proye (1983) confirmaram que o pré-requisito para a regeneração de estruturas periodontais é baseado na adesão do coágulo à superfície radicular, promovendo o que os autores denominaram de "conexão da fibrina". Neste estudo, 24 dentes, incluindo incisivos e molares, de macacos foram extraídos e as fibras periodontais removidas da superfície radicular. Em 12 dentes, foi realizada a aplicação tópica com ácido cítrico sobre as superfícies radiculares. Os dentes foram então lavados em salina e reimplantados, resultando em um período extra-alveolar com menos de 18 minutos. As observações foram realizadas em períodos de 1,3, 7 e 21 dias após o reimplante. Os resultados mostraram que no grupo de dentes tratados com o ácido cítrico, foi possível observar, no primeiro dia, uma rede de fibrina aderida à superfície radicular. Aos 7 dias, essa região encontrava-se ocupada por tecido celular e aos 21 dias, pelas fibras colágenas. Os autores, concluindo, asseveram que a reinserção de fibras colágenas foi precedida por infiltração de fibrina e que essa infiltração foi um evento inicial na resposta de cicatrização da ferida.

Sendo os componentes do sangue substâncias fundamentais para o processo de reparo, por que não de sua utilização como modalidade terapêutica em

experimentos que envolvam reparo de tecidos danificados por doenças ou traumas? Foi baseado neste raciocínio que Nasjleti e sua equipe publicaram estudos utilizando esses materiais em cirurgias periodontais e também em reimplantes dentários.

Em 1986, Nasjleti et al. avaliaram o reparo do ligamento periodontal em macacos após reimplante utilizando o plasma liofilizado, um material que contém fibrinogênio, fibronectina e o fator XIIIa plasmático. O plasma liofilizado era obtido a partir do sangue venoso associado ao anticoagulante ácido citrato-dextrose. Este material era, posteriormente, centrifugado a 130 G durante 10 minutos e o sobrenadante era transferido para um tubo para o processo de liofilização. Um total de 24 incisivos e pré-molares foram reimplantados após a aplicação de 800mg do plasma liofilizado reconstituído em 1 ml de solução salina sobre as superfícies radiculares e paredes do osso alveolar, sendo que, o tempo extra-alveolar não ultrapassava 5 minutos. Os dentes controle foram reimplantados apenas sob o efeito da solução salina no mesmo período extra-alveolar. As observações foram realizadas 1, 3, 7, 14, 28 e 45 dias após o reimplante. Os dentes foram examinados por análises histológicas e por auto-radiografias. Os resultados revelaram uma reinserção dos tecidos de conexão de forma precoce e significativamente maior no grupo tratado quando comparado ao grupo controle, além de redução de resposta inflamatória e inibição de reabsorção da superfície radicular.

No ano seguinte, Nasjleti et al. (1987b) analisaram o efeito do plasma liofilizado em cirurgias periodontais, associado ao tratamento radicular com o ácido cítrico. As raízes de primeiros e segundos pré-molares e primeiros e segundos

molares de macacos eram expostas e condicionadas com o ácido cítrico seguido da aplicação do plasma liofilizado reconstituído em solução salina. Raízes tratadas apenas com o ácido cítrico foram utilizadas como controle. As observações foram realizadas após 3, 7, 14, 21, 28 e 45 dias após o procedimento cirúrgico. Os autores observaram diferenças entre os dois grupos de tratamento em todos os períodos, entretanto, após 21 dias essas diferenças eram menos significantes. No último período de observação (45 dias), ambos os grupos apresentavam fibras colágenas em conexão com a superfície radicular, diminuição de células inflamatórias, presença de canais vasculares dispersos, apresentando diferenças quanto a localização do epitélio juncional onde, no grupo controle, o mesmo mostrava-se situado mais apicalmente. Estes resultados levaram os autores a concluir que a utilização do plasma liofilizado associado ao ácido cítrico promove uma melhoria na cicatrização.

No mesmo ano, Nasjleti et al. (1987a), utilizaram a fibronectina, uma proteína solúvel presente no plasma sanguíneo, em incisivos e pré-molares de macacos. O período extra-alveolar foi de 5 minutos. Os dentes e as paredes alveolares foram banhados com fibronectina diluída em salina em uma proporção de 400 µg/ml. Dentes banhados apenas com salina foram utilizados como controle. As observações foram realizadas 1, 3, 7, 14, 28 e 45 dias após o reimplante. Os autores encontraram diferenças significantes entre os dois grupos, onde a fibronectina foi capaz de promover uma melhor cicatrização através do posicionamento precoce do coágulo de fibrina, aumento do tecido de conexão e proliferação celular, redução da resposta inflamatória e inibição de reabsorção da camada cementária e respostas de anquilose.

2.2 COMPONENTES DO SANGUE: PLASMA POBRE EM PLAQUETAS (PPP) E PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

Na ocorrência de uma lesão traumática dá-se o início a uma série de eventos objetivando a substituição do tecido primário da lesão por um tecido mais adequado funcionalmente. Entre os eventos estabelecidos, especialmente na ocorrência de uma injúria traumática onde ocorre dano vascular, como no caso da avulsão dentária, ocorre o controle do sangramento, ou seja, a hemostasia. Essa ocorrência é combinada pela sucessão de eventos como a vasoconstrição, agregação e ativação plaquetárias, ativação da coagulação, cascatas do complemento e cininas, e ativação do plasminogênio (GOTTRUP; ANDREASEN, 2001).

Os aspectos fisiológicos da hemostasia acima mencionados podem ser divididos em três grupos de fenômenos fisiológicos: histovasculoplaquetários, plasmáticos e trombotinâmicos (SANTOS; SANTOS, 2004).

A lesão vascular é seguida de vasoconstrição reflexa com conseqüente diminuição do fluxo do sangue e aumento de sua viscosidade. Essa viscosidade permitirá a concentração de células sangüíneas como os leucócitos, as hemácias e principalmente as plaquetas (SANTOS; SANTOS, 2004). Quando do rompimento da integridade do endotélio, há exposição do subendotélio e dos componentes do tecido conjuntivo, incluindo o colágeno tipo IV e V que é especialmente importante na promoção e agregação plaquetária e também de proteínas estruturais (GOTTRUP; ANDREASEN, 2001). Com a exposição do subendotélio e dos tecidos adjacentes, as

plaquetas exercem sua primeira função, ou seja, a adesividade e se aderem a qualquer superfície diferente do endotélio vascular íntegro. A seguir, exercem sua segunda função: agregabilidade, ou seja, sua capacidade de aderir a outras plaquetas e formar o trombo plaquetário ou trombo branco (BERNE; LEVY, 2000). O trombo plaquetário é impermeável ao plasma e serve como um selante para a vasculatura rompida e também na prevenção da invasão bacteriana (WAHL; WAHL, 1992).

Em casos onde o sangramento é menor o trombo plaquetário é suficiente para promover a hemostasia. Entretanto, quando se trata de volumes hemorrágicos maiores, outros mecanismos serão necessários para a promoção da hemostasia, chamados estes de mecanismos plasmáticos ou simplesmente coagulação. Essa fase é definida como aquela em que o organismo transforma o tecido sanguíneo em gel e a seguir, sólido (SANTOS; SANTOS, 2004). O passo crucial na coagulação é a conversão do fibrinogênio em fibrina, criando-se assim uma rede que possibilitará a captura de frações do plasma e elementos formados. Este coágulo sanguíneo de fibrina é formado tanto intra como extravascularmente e dá suporte ao coágulo plaquetário inicial (GOTTRUP, ANDREASEN, 2001).

A seguir, os mecanismos de coagulação intrínsecos e extrínsecos são ativados, cada um dando início às cascatas que converterão protrombina em trombina (a mais potente substância coagulante conhecida). Quantidades ínfimas de trombina conseguem transformar grandes volumes de fibrinogênio em fibrina instável, que, por sua vez, se polimerizará para formar o coágulo (GOTTRUP, ANDREASEN, 2001;

SANTOS; SANTOS, 2004). Os produtos da cascata de coagulação regulam as células na área da ferida. Assim, a trombina intacta serve como um potencial estimulador para o crescimento para fibroblastos e células endoteliais (CHEN, BUCHANAN, 1975; WEKSLER et al., 1978). A fibrina age como substância quimiotática para os monócitos e induz a angiogênese (DVORAK et al., 1987).

Caso a hemostasia não seja obtida, o sangue continuará a extravasar pelo tecido, levando a um hematoma e um coágulo que consiste em fração plasmática do soro, elementos formados e fragmentos de fibrina. A presença de tal hematoma retardará a cicatrização da ferida e aumentará o risco de infecção (GOTTRUP; ANDREASEN, 2001).

A última fase da hemostasia, ou seja, os fenômenos trombotinâmicos envolvem as plaquetas que estão contidas dispersamente no coágulo as quais sofrem uma transformação metabólica denominada metamorfose viscosa das plaquetas. Através dessa transformação, essas células emitem pseudópodes que, em sua extensão máxima, encontram outras células que se aderem formando uma rede celular plaquetária. Ocorre, então, a produção de uma proteína, a tromboastenina, que, liberando energia, promove a retração dos pseudópodes e do coágulo. Essa retração, por sua vez, expulsa o plasma que permeia o trombo, tornando-o mais firme, tamponante e eficaz. Com isso, se finda o processo de hemostasia (SANTOS; SANTOS, 2004).

No ambiente delimitado pelo coágulo sangüíneo, iniciam-se, então, todos os processos para a regeneração ou reparo tecidual através de fatores de crescimento liberados pelas plaquetas (GUYTON; HALL, 2002). Neste contexto, tem-se sugerido que o termo *regeneração* seja utilizado para o processo biológico pelo qual a estrutura e função do tecido dilacerado ou perdido são completamente restauradas, ao passo que *reparo* é um processo biológico pelo qual a estrutura e função do tecido dilacerado ou perdido são recuperados por novo tecido que não restaura a estrutura e função originais (GILLMAN, 1961).

Para que a regeneração tecidual ocorra, é necessário a presença de células especializadas com potencial de formar o tecido lesado, sinais moleculares específicos que induzem essas células e um arcabouço apropriado que mantenha as células e ao mesmo tempo permita a ação dos sinais sobre as mesmas, constituindo os três pilares da Engenharia Tecidual (SCHELER et al., 2009). O coágulo sangüíneo é estruturado sobre estes três pilares e constitui em local apropriado para que os processos regenerativos ocorram. Os constituintes naturais do coágulo, incluindo a fibrina, as plaquetas e os fatores de crescimento são alvos de pesquisas na tentativa de imitar os caminhos naturais de regeneração tecidual (MESSORA, 2005).

Como já comentado anteriormente, a fibrina é obtida a partir da conversão de fibrinogênio pela ação da trombina e constitui no suporte ou arcabouço para que o coágulo desempenhe seu papel no processo de reparo. A fibrina serviria então como uma matriz para a migração de células ao local danificado (GOTTRUP; ANDREASEN, 2001). Tem sido demonstrado também que a fibrina provoca a migração de

fibroblastos e a angiogênese, as quais iniciam precocemente a invasão celular no coágulo (DVORACK et al., 1987; KNIGHTON et al., 1982).

Na tentativa de reproduzir os efeitos biológicos da fibrina, produtos derivados desse material, sob a forma de um adesivo ou cola de fibrina, têm sido utilizados em cirurgia cardiovascular, neurocirurgia, cirurgia oftalmológica, cirurgia reconstrutiva e cirurgia buco-maxilo-facial (HOTZ, 1991; KNIGHTON et al., 1982; SALTZ et al., 1991; SEGURA-CASTILLO et al., 2005; SILVER et al., 1995). Esse material pode ser obtido comercialmente ou preparado a partir de material sanguíneo do próprio paciente, diminuindo, nessa segunda maneira, o risco de infecções. A fibrina autóloga é produzida por meio de crioprecipitação ou precipitação por etanol, sulfato de amônia e polietilenoglicol, onde é então obtido o fibrinogênio. Essa solução de fibrinogênio é misturada à trombina, transformando-se em adesivo de fibrina (SOFFER et al., 2003).

O fibrinogênio é uma proteína plasmática de alto peso molecular e solúvel no plasma sanguíneo, onde compreende 2% do volume total do sangue. Essa proteína é ricamente concentrada em uma fração plasmática muito importante nos processos de regeneração, o Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) ou Plasma Rico em Fibrinogênio (PRF) (CHAGAS et al., 2004; DOHAN et al., 2006). A fibrina, derivada do fibrinogênio, não é somente um hemostático, mas também está ligada a processos regenerativos (DVORAK et al., 1987; KNIGHTON et al., 1982; POLSON; PROYE, 1983; SCHNABEL et al., 2008).

A maioria dos estudos, entretanto, direciona-se à aplicação de outra porção de fração plasmática: o Plasma Rico em Plaquetas (PRP). A diferença importante quanto à composição, entre o PRP e o PPP, é a presença da alta concentração de plaquetas e a concentração inata de fibrinogênio no PRP (CARLSON; ROACH JUNIOR, 2002).

As plaquetas são células formadas na medula óssea a partir da fragmentação do megacariócito, seu antecedente medular, e possuem um período de vida de 7 a 10 dias no sangue (HARCHER; FINCH, 1969). Como já explicitado anteriormente, as plaquetas possuem propriedades de adesão, ativação e agregação. Quando da agregação, onde há acúmulo das plaquetas, ocorrerá sua degranulação com liberação do conteúdo dos grânulos alfa, os quais contem fatores de crescimento (EVERTS et al., 2006).

Fatores de crescimento são proteínas que funcionam como agentes sinalizadores para as células e exercem vários efeitos sobre os processos de reparo e regeneração (GOTTRUP; ANDREASEN, 2001). Estes polipeptídeos são a chave para regular diversos eventos celulares, tais como síntese de DNA, quimiotaxia, citodiferenciação e síntese de matriz (ANITUA, 1999).

Importantes fatores de crescimento são liberados durante o processo de degranulação das plaquetas como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de transformação beta (TGF- β), fator de crescimento similar à insulina (IGF-I) (LENHARO, MENDONÇA, 2002) e também fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblasto (FGF),

proteína morfogenética do osso (BMP) e fator de crescimento epidermal (EGF) (LENHARO et al., 2004).

Os fatores de crescimento possuem três formas de ação: 1) parácrina, onde os fatores de crescimento secretados por uma célula são capazes de estimular uma segunda célula vizinha; 2) autócrina, onde os fatores liberados agem na própria célula secretora e 3) endócrina, onde os fatores de crescimento podem influenciar uma célula com fenótipo diferente da célula originária e a qual se localiza em um local distante (EVERTS et al., 2006).

Em se tratando dos fibroblastos, principais células que compõem o ligamento periodontal, vários fatores de crescimento mencionados presentes nas plaquetas possuem ação direta ou indireta sobre essas células. O fator de crescimento de transformação beta (TGF- β) é responsável pela ativação e proliferação de fibroblastos (STEENFOS et al., 1990), aumentando a síntese de proteínas de matriz extracelular como o colágeno, fibronectina e laminina, possibilitando a promoção do reparo dos tecidos depois de terem sido controladas as reações imunes e inflamatórias (ABBAS et al., 2003). O efeito do TGF- β pode ser aumentado pela presença de PDGF e fator de crescimento epidermal (EGF), dois fatores também presentes nas plaquetas (LYNCH et al., 1991).

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é encontrado nos grânulos a plaquetários, mas também são sintetizados pelos macrófagos e o endotélio. O PDGF é o primeiro fator de crescimento presente em uma ferida e inicia

a cicatrização dos tecidos de conexão, promovendo a síntese de colágeno e proteínas (EVERTS et al., 2006). Um importante efeito da liberação de PDGF é na ativação e proliferação de fibroblastos cuja migração ordenada ao local da ferida correlaciona-se com a concentração direta deste fator (DEUEL; HUANG, 1984).

O fator de crescimento similar à insulina (IGF), na sua versão 1, ou seja, IGF-1, pode estimular a síntese de DNA dos fibroblastos do ligamento periodontal, provavelmente via união com os receptores da superfície celular de alta afinidade (BLOM et al., 1992). Quando administrado juntamente com o PDGF ou FGF, ocorre aumento da produção fibroblástica e produção de colágeno (LYNCH et al., 1989a).

Já o fator de crescimento de fibroblasto (FGF), em sua forma básica, ou seja, FGF-b é um importante mitógeno para fibroblastos e também células endoteliais, células musculares lisas e células nervosas periféricas, além de estimular a epitelização (GOTRUPP, ANDREASEN, 2001). Foi provado que um trauma provocando a liberação de enzimas degradantes de heparina pelas plaquetas é capaz de liberar FGF-b e promover o início da cascata angiogênica (OOSTA et al., 1982). Nos tecidos orais, a presença de FGF-b junto à dentina tem mostrado influenciar positivamente a adesão, migração e proliferação de células do ligamento periodontal (TERRANOVA; WIKESJÖ, 1987).

Além das importantes propriedades isoladas dos fatores de crescimento os quais são liberados pelas células plaquetárias, estudos demonstram uma potencialização desses efeitos quando estes fatores atuam de forma sinérgica. Assim,

o PDGF associado ao IGF-1 produz aumento significativo sobre a cicatrização do tecido conjuntivo e o epitélio (LAWRENCE et al., 1986); PDGF e TGF- β promovem a síntese de colágeno e a proliferação de fibroblastos (LYNCH et al., 1989a) e PDGF e IGF podem ser potentes quimiotáticos e mitógenos para cementoblastos, fibroblastos e osteoblastos (LYNCH et al., 1989b). Sendo assim, o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) com sua composição formada pela alta concentração de células plaquetárias torna-se um palco perfeito para que o sinergismo dos fatores de crescimento ocorra.

Além dos fatores de crescimento, o gel de PRP contém fibrina, fibronectina e vitronectina, proteínas capazes de favorecer a adesão celular e atuam como uma matriz para a formação de osso, tecido conjuntivo e epitélio (MARX, 2004). Porém, diferentemente da cola ou adesivo de fibrina, possui a mesma concentração das referidas proteínas de um coágulo sanguíneo normal (MARX, 2001). O PRP é então um composto autógeno, atóxico, não imunoreativo e capaz de promover e potencializar eventos cicatriciais como mitogênese, angiogênese e quimiotaxia (LENHARO et al., 2004).

Os estudos utilizando o Plasma Rico em Plaquetas têm sido direcionados na análise do potencial deste material em promover o reparo ósseo. Esses estudos constataram o potencial de reparo ósseo do PRP associado a hidroxiapatita (OKUDA et al., 2005), osso bovino (LEKOVIC et al., 2002) e esponja de colágeno bovina (WILTFANG et al., 2004). Resultados favoráveis foram relatados por Anitua (1999) e Sammartino et al. (2005) no reparo ósseo de cavidades alveolares tratadas apenas com o PRP. Em odontopediatria, o material apresentou-se também como uma

abordagem segura e eficaz no tratamento ósseo em pós cirurgias de enucleações císticas em crianças, como relatado por Shashikiran et al. (2006).

Mais recentemente, o PRP também tem sido aplicado no reparo de outros tipos de tecidos. Lindeboom et al. (2007) avaliaram o efeito do PRP na cicatrização da mucosa oral em 10 pacientes edêntulos saudáveis os quais haviam sido submetidos a uma elevação bilateral do chão da cavidade sinusal. Os autores observaram que a utilização do PRP possui um forte efeito na regeneração capilar dessas feridas. Nagaie et al. (2007), em um estudo em coelhos, relataram resultados satisfatórios na diminuição da degeneração do disco intervertebral em cartilagens com o emprego do PRP associado a microesferas de gelatina.

A utilização do PRP em reimplantes dentários foi relatado em dois casos clínicos por Tözüm et al., em 2006 e por Demir et al., em 2007. Em ambos os casos, o reimplante foi realizado de maneira intencional em dentes condenados por doença periodontal avançada. Após a realização do tratamento endodôntico, os dentes foram cirurgicamente extraídos e o PRP, preparado do sangue periférico dos respectivos pacientes, foi aplicado no local do defeito após o reimplante do elemento dentário. Em ambos os relatos, através de acompanhamentos clínicos e radiográficos, os autores observaram regeneração óssea e cicatrização de tecido mole muito satisfatória.

Okuda et al. (2003) constataram, em um estudo *in vitro*, que o plasma rico em plaquetas contém altos níveis de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento transformador beta (TGF- β) que modulam a

proliferação de células osteobásticas, fibroblásticas, epiteliais e aquelas derivadas do ligamento periodontal. Resultados semelhantes também foram observados por Annunziata et al. (2005) e Han et al. (2007) onde verificaram que o PRP aumenta a proliferação de células derivadas do ligamento periodontal *in vitro* constatado através do aumento da produção de colágeno Tipo I. Em ambos os estudos, também foi constatado um aumento de atividade da fosfatase alcalina, uma enzima que marca de forma precoce a fenotipagem osteoblástica, indicando a diferenciação de células do ligamento periodontal em células da linhagem osteoblástica.

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP), assim como o Plasma Pobre em plaquetas (PPP) são obtidos a partir do sangue total através de processos de separação por diferença nas densidades celulares, através da dupla centrifugação. Whitmann et al. (1997) preconiza a retirada de aproximadamente 450 ml de sangue do paciente diretamente para uma bolsa contendo o anticoagulante citrato-dextrose. O sangue é inicialmente centrifugado à 5600 rpm para separar o Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) dos eritrócitos e do "buffy coat", que contém plaquetas e leucócitos. A velocidade é então reduzida para 2400 rpm, permitindo a separação do "buffy coat" da camada vermelha. O PRP é então misturado com trombina bovina (10.000 unidades) dissolvida em 10 ml de cloreto de cálcio a 10%.

Entretanto, o método acima mencionado é limitado pela tecnologia empregada e pelo volume de sangue necessário, restringindo seu uso a ambientes hospitalares (TÖZUM; DEMIRALP, 2003). Sendo assim, diversos protocolos foram introduzidos para a produção de PRP em pequena quantidade, utilizando-se centrifugas de

bancadas e controladas eletronicamente, tornando a técnica passível de ser executada em ambientes ambulatoriais e consultórios odontológicos (WEIBRICH; KLEIS, 2002).

Sonnleitner et al. (2000) propõem uma técnica onde o sangue colhido através de punção venosa é acondicionado em tubos à vácuo contendo o anticoagulante citrato de sódio. Os tubos são centrifugados inicialmente a 160 G por 20 minutos, resultando na divisão do sangue em três componentes básicos, ou seja, células vermelhas que se depositam no fundo do tubo; no centro do tubo o PRP e na porção superior o PPP. Para que a concentração de plaquetas atinja seu ponto máximo, os autores indicam que um ponto seja marcado aquém da linha que separa o plasma das células vermelhas em 6 a 8 mm. Todo o líquido acima desse ponto é transferido a um novo tubo sem o anticoagulante e novamente centrifugado a 400 G por 15 minutos, obtendo-se, assim, o PRP.

Após a obtenção do PRP, é necessário sua coagulação para que ocorra a liberação dos fatores de crescimento dos grânulos α plaquetários e formação de uma rede de fibrina sobre a qual os fatores de crescimento poderão atuar (MARX et al., 1998). Diversos protocolos foram instituídos para a obtenção do gel de PRP, incluindo a utilização de cloreto de cálcio a 10% associado à trombina bovina ou apenas o cloreto de cálcio (LEÃO, MAGINI, 2004).

O protocolo que mais tem sido utilizado pelos pesquisadores é o proposto por Marx (2000). Este protocolo utiliza uma mistura de 10 ml de cloreto de cálcio a 10%

com 10.000 unidades de trombina bovina. Landesberg et al. (1998) condenam a utilização da trombina bovina devido ao risco deste material possuir restos de fator V da coagulação e, por isso, estimular negativamente o sistema imune humano, combatendo o próprio fator V humano.

Tsay et al. (2005), utilizando métodos de preparo de PRP associado à trombina, observaram um aumento de 90% de liberação de fatores de crescimento derivados do PRP, tais como o PDGF e TGF- β . Quanto aos problemas de coagulopatias com a utilização da trombina, Marx (2004) esclareceu que os relatos com esse tipo de problema ocorreram em uma época em que a trombina era processada com alto teor de contaminação do fator V bovino, além de serem utilizadas altas doses desse material (acima de 10.000 unidades) diretamente sobre o local da ferida onde é facilmente absorvido pela circulação sanguínea.

Anitua (1999), em um protocolo simplificado, dispensou a utilização de bolsas de coletas e, utilizando-se tubos e minicentrífugas, obteve o PRP a partir de uma pequena porção de sangue. Nesse protocolo, o volume de cerca de 1,2 ml por tubo é associado a 50 μ l de cloreto de cálcio a 10% e, segundo o autor, após 5 a 10 minutos da mistura, o gel é formado.

2.3 A INOVAÇÃO: TERAPIA CELULAR E ENGENHARIA TECIDUAL

Como já comentado durante essa revisão, o termo *regeneração* denota o restabelecimento das características estruturais e funcionais do tecido original

quando há ocorrência de destruição de um tecido. Em muitas situações clínicas, a regeneração do Ligamento Periodontal, bem como de outras estruturas lesadas após a avulsão dentária, é uma situação extremamente difícil de ser alcançada.

As inovações científicas têm aberto novos horizontes para o restabelecimento de estruturas lesadas por doenças e traumas. O conceito de formar novos tecidos para o restabelecimento de estruturas danificadas ou degeneradas e órgãos perdidos fundamenta-se no centro da prática da variabilidade biotecnológica referido, em um termo geral, como engenharia tecidual (BIANCO; ROBEY, 2001).

Atualmente, as estratégias empregadas para a engenharia tecidual podem ser categorizadas em três classes: a condutiva, a indutiva e o transplante celular. A abordagem condutiva é realizada através da utilização de biomateriais de uma forma passiva com o intuito de facilitar o crescimento ou a capacidade de regeneração dos tecidos já existentes. A estratégia da engenharia tecidual indutiva envolve a ativação de células próximas ao local do defeito através de sinais biológicos específicos. Já o transplante de células utiliza células cultivadas em laboratório as quais são depositadas em estruturas apropriadas (*scaffolds*). Posteriormente, o *scaffold* contendo as células específicas é implantado no local do defeito. Este último modelo reflete verdadeiramente a natureza multidisciplinar da engenharia tecidual com o envolvimento de vários profissionais como o cirurgião, o engenheiro e o biólogo celular (KAIGLER; MOONEY, 2001).

A premissa básica da Engenharia Tecidual é baseada no fato de que, através da manipulação controlada do microambiente extracelular, as células poderão ser guiadas de maneira que possam se organizar, se proliferar e se diferenciar, formando, assim, uma matriz extracelular mais funcional e por fim, um novo tecido funcional. Este controle requer sinais moleculares autócrinos, parácrinos e endócrinos, interações da matriz celular, forças mecânicas e contatos célula com célula que resultem na formação de uma estrutura tridimensional e funcional (SCHELLER et al., 2009). De uma forma resumida, estes são os três pilares que compõem a engenharia tecidual: célula, matriz e sinais moleculares específicos (SCHELLER et al., 2009; SLAVKIN; BARTOLD, 2006).

Um dos desafios da engenharia tecidual envolve a identificação mais apropriada de cada um de seus componentes. Sendo assim, o tipo de matriz ou *scaffold* e também a forma como ele se apresenta (gel, esponja ou fibra) pode afetar significativamente a resposta biológica (JAMES et al., 1999). Da mesma maneira, a identificação da fonte celular para aplicação desejada (células autógenas *versus* alógenas; células primárias, de linhagem, geneticamente modificadas *versus* células-tronco; células de origem embrionária *versus* adulta; células-tronco de origem mesenquimal *versus* pulpar *versus* adiposa *versus* ligamento periodontal) é uma outra preocupação da engenharia tecidual (MAO et al., 2006). Os sinais moleculares para diferenciações teciduais específicas e a abordagem da liberação desses fatores representa o desafio dentro do contexto do terceiro pilar da engenharia tecidual (GIANNOBILE, 1996).

Em relação aos tipos celulares, estudos têm mostrado que o número de tecidos com potencial regenerador tem aumentado significativamente devido, em grande parte, ao progresso da biologia das células-tronco (BIANCO; ROBEY, 2001). Células-tronco pluripotentes, ou seja, capazes de gerar células de outros órgãos e tecidos foram retiradas de tecido fetal humano e mostraram habilidade em desenvolver uma variedade de células diferenciadas (PITTENGER et al., 1999). Essas células são classificadas como pluripotentes por possuir a habilidade de originar células dos três folhetos embrionários, ou seja, mesoderma, ectoderma e endoderma (LEMOLI et al., 2005).

Além das células-tronco de origem embrionária, muitos tecidos adultos também possuem populações destas células com capacidade de regeneração após trauma, doença ou envelhecimento. As células-tronco adultas têm sido encontradas em uma variedade de tecidos incluindo medula óssea, sangue periférico, cérebro, polpa dentária, vasos sanguíneos, músculo esquelético, pele, córnea, pâncreas, entre outros (LEMOLI et al., 2005). A medula óssea, além de ser o maior reservatório de células-tronco hematopoiéticas (HSCs) os quais renovam continuamente os elementos sanguíneos circulantes, apresentam também células-tronco mesenquimais (PITTENGER et al., 1999).

Estudos mostram que as células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (BMMSCs) são multipotentes e capazes de se diferenciarem em células de tecidos derivados do mesoderma como osso, cartilagem, músculo, tendão, estroma medular, tecido adiposo e em uma variedade de tecidos de conexão (BIANCO;

ROBEY, 2001). As estratégias da terapêutica destas células são baseadas na suposição de que, em um tecido específico e em resposta a sinais moleculares, podem transformar-se no tecido de origem (RISBUD; SHAPIRO, 2005). BMMSCs podem ser expandidas *in vitro* para que um número apropriado de células possa ser obtido e posteriormente, estimuladas a se diferenciarem na linha de tecido mesenquimal de interesse (PITTINGER et al., 1999).

Os sinais moleculares que dirigem a proliferação das células-tronco têm sido alvo de pesquisas (THESLEFF; SHARPE, 1997). Estudos têm identificado famílias de proteínas capazes de desencadear a proliferação e diferenciação das células-tronco mesenquimais, tais como: fatores de crescimento de fibroblasto - FGF (HORI et al., 2004), fator β de transformação e crescimento- TGF- β (LI et al., 2005), fatores derivados de crescimento da plaqueta – PDGF (LUCARELLI et al., 2003) e proteínas morfogenéticas do osso- BMP (SEKIYA et al., 2005).

A estrutura (*scaffold*) que servirá de suporte para o desenvolvimento das células mesenquimais deve possuir propriedades biomecânicas satisfatórias, provendo o espaço necessário para o recrutamento e proliferação celular, sobrevivência destas células no meio de cultura onde foram implantadas, além de permitir a ação dos fatores de crescimento, promovendo, assim, a formação do novo tecido (BARTOLD et al., 2006). Do ponto de vista tecidual, este material vai fazer o papel de vigamento, no qual novo tecido será formado. Em nível celular obtém-se

uma superfície na qual as células-tronco poderão se aderir, proliferar e diferenciar (POTIER; PETITE, 2005).

Uma grande variedade de matrizes e estruturas tem sido estudada para que os objetivos da regeneração do complexo dental e crânio-facial sejam atingidos. A escolha de uma estrutura apropriada desempenha um papel crucial na morfogênese de órgãos e tecidos. Ao se realizar uma escolha de uma matriz ou estrutura para a regeneração periodontal, cuidado especial é requerido considerando as estruturas que envolvem o periodonto, ou seja, cimento, ligamento periodontal e osso alveolar (MOIOLI et al., 2007). Além disso, devido à complexidade do periodonto, sua completa regeneração requer uma população de células multipotentes (BARTOLD et al., 2006).

No campo da engenharia tecidual utilizando as células-tronco mesenquimais, muitos estudos têm relatado resultados promissores com o emprego do plasma rico em plaquetas como um apropriado *scaffold* para essas células, tanto em estudos *in vitro* (LIN et al., 2006; LUCARELLI et al., 2003; OLIVA et al., 2005) como *in situ* (FILHO CERRUTI et al., 2007; ITO et al., 2006; TOBITA et al., 2008; YAMADA et al., 2004).

Lucarelli et al. (2003) investigaram o potencial dos fatores de crescimento liberados pelo PRP sobre as células-tronco do estroma da medula óssea retirada de humanos na proliferação e diferenciação dessas células *in vitro*. As células aspiradas da medula óssea foram cultivadas em meio de cultura, sendo que as células não

aderentes foram descartadas e as aderentes (células-tronco mesenquimais), mantidas para proliferação. O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) foi obtido dos pacientes, sendo que 4 ml de trombina foi adicionado a 16 ml de PRP. Diferentes concentrações de PRP, de 1% a 10% foi adicionado às culturas e teste de proliferação celular (MTT) foi realizado para observar a concentração de PRP que afetaria a proliferação celular. Além disso, os autores observaram se a concentração de 10% de PRP influenciaria na diferenciação das células-tronco mesenquimais na linhagem condrogênica e osteogênica em culturas tratadas com dexametasona. Os autores observaram que o aumento de número de células-tronco mesenquimais era de caráter dose-dependente à concentração de PRP nas culturas, mesmo na ausência de suplemento com soro fetal bovino, sendo que, quando o PRP era removido, as células voltavam à sua taxa normal de proliferação. A concentração de 10% de PRP nas culturas com dexametasona mostraram sinais de deposição de minerais, provando a diferenciação dessas células em condroblastos e osteoblastos. Através deste estudo, os autores demonstraram que as plaquetas constituem em uma fonte de fatores de crescimento para a proliferação de células mesenquimais.

Resultados semelhantes foram encontrados por Oliva et al. (2005) onde foi observada uma resposta de proliferação de células estromais da medula óssea diretamente proporcional à concentração do PRP no meio de cultura, levando os autores a indicarem este material como um método eficaz na proliferação das células em uma fase anterior à sua utilização clínica na regeneração de tecido ósseo.

Lin et al. (2006), através da construção de um sistema de liberação dos fatores de crescimento do PRP a partir de um biopolímero a base de alginato, propuseram, através deste sistema, coordenar os eventos moleculares de diferenciação óssea em células-tronco mesenquimais. Os autores observaram que o controle dos fatores de crescimento liberados pelas plaquetas possuía propriedade osteoindutiva e osteocondutiva para as células mesenquimais *in vitro*.

Extrapolando esses resultados promissores *in vitro* para os estudos *in vivo*, Yamada et al. (2004), em um estudo em cães, investigaram a regeneração óssea utilizando células-tronco mesenquimais da medula óssea (BMMSCs) e o plasma rico em plaquetas (PRP) como substância de suporte (*scaffold*) e liberador de fatores de crescimento para a proliferação e diferenciação destas células. Células mesenquimais derivadas da medula óssea foram cultivadas e proliferadas em meio de Dulbecco's modificado por Eagle (DMEM) com baixo teor de glicose. Posteriormente, defeitos ósseos foram realizados nos cães e preenchidos com apenas o PRP, BMMSCs associado ao PRP e partículas autógenas de osso e medula. À avaliação histológica, os autores observaram uma melhor regeneração óssea e neovascularização nos defeitos completados com BMMSCs associado ao PRP. Mais recentemente Yamada et al. (2006) relataram um caso clínico da mesma técnica que fora empregada no estudo experimental anteriormente descrito em um paciente com doença periodontal. A avaliação clínica e radiográfica demonstraram redução de 4mm na profundidade da bolsa periodontal, ausência de sangramento e mobilidade dentária, além de redução do defeito ósseo.

A utilização de PRP com células da medula óssea foram estudadas em humanos por Filho Cerruti et al. (2007). O estudo foi realizado em 32 pacientes com idades entre 45 e 75 anos com indicação para implantes dentários, porém que apresentavam tecido ósseo insuficiente para o procedimento. Primeiramente, um arcabouço à base de fibronectina e laminina foi obtido a partir do Plasma Pobre em Plaquetas dos pacientes. Células mononucleares foram aspiradas da medula óssea da crista do osso íliaco ou do osso esterno dos pacientes, associadas ao arcabouço mencionado e transportadas aos defeitos ósseos dos pacientes associado ao Plasma Rico em Plaquetas e enxertos ósseos. As células aderidas ao arcabouço, as quais não foram utilizadas nas cirurgias, foram também cultivadas para observação do comportamento das mesmas *in vitro*. O resultado *in vitro* mostrou a existência de células aderidas ao arcabouço com características de células hematopoiéticas, sendo que, após 24 horas as células aderentes mostravam características fibroblastóides, sugerindo sua origem mesenquimal. Os resultados imunológicos, entretanto, mostraram a existência de ambas as linhagens, ou seja, hematopoiéticas e mesenquimais. Os resultados clínicos revelaram uma taxa de sucesso de 94,7% entre os pacientes operados, mostrando um ganho ósseo em largura e comprimento suficiente para a instalação dos implantes. O processo de cicatrização observados nesses pacientes foi associado pelos autores à presença das células mesenquimais presentes na fração mononuclear da medula óssea e aos fatores de crescimento contidos no PRP.

3 Proposição

Foi propósito da presente investigação, avaliar através de análises histomorfológica, histomorfométrica e de imuno histoquímica, as alterações teciduais que ocorrem após reimplante de dentes de cães utilizando-se plasma pobre em plaquetas (PPP), plasma rico em plaquetas (PRP) e células-tronco mononucleares originárias da medula óssea de cães.

4 Material e Método

Previamente à realização deste estudo, o projeto foi submetido à apreciação da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, obtendo parecer favorável (Protocolo nº 57/06) (Anexo A).

4.1 Animais

Para o presente trabalho, foram utilizados quatro cães de ninhadas diferentes, sem raça definida, sendo duas fêmeas e dois machos, com idade aproximada de um ano, de porte semelhante e com peso médio de 13,2 Kg. Inicialmente, todos os cães foram vacinados com três doses da vacina V8 (Vencomax 8, Vencofarma, Londrina, PR, Brasil) com intervalo de 30 dias entre casa dose, e vermifugados com 2 doses de vermífugo oral (Canex composto, Vetbrands, Jacareí, SP, Brasil) com intervalo quinzenal entre as doses. Todos os animais também receberam uma aplicação mensal de anti-carrapaticida (Frontline® Plus, Merial Saúde Animal Ltda., Paulínia, SP, Brasil) e foram mantidos em todo o período experimental utilizando coleira antiparasitária (Scalibor®, Intervet do Brasil Veterinária Ltda., Cruzeiro, SP, Brasil) para proteção contra o mosquito flebótomo transmissor da Leishmania. Além disso, durante a permanência dos animais no Biotério, todos os cuidados diários de

manipulação, limpeza e alimentação foram observados e realizados por pessoal treinado.

4.2 Tratamento Endodôntico

Todos os elementos dentários utilizados para o reimplante foram inicialmente submetidos a uma sessão de tratamento endodôntico. Os dentes utilizados foram os incisivos centrais e laterais superiores, os incisivos laterais e intermédios inferiores e os segundos pré-molares e terceiros pré-molares da maxila e mandíbula, totalizando 16 dentes em cada cão. Um dos animais apresentava agenesia dos segundos pré-molares superiores e inferiores, sendo utilizado, neste animal, também os incisivos centrais inferiores, resultando em 14 dentes.

Para a realização deste procedimento, os animais receberam medicação pré-anestésica por via intra-muscular de Acepran 1% (Univet S/A Indústria Veterinária, São Paulo, SP, Brasil) e cloridrato de cetamina (Ketamina Agener 10%, União Química Farmacêutica Naconal S/A, Embu-Guaçu, SP, Brasil). Após, os animais foram anestesiados por via intramuscular com 0,05 ml/Kg/peso de Cloridrato de Xilazina (Calmium, União Química Farmacêutica Naconal S/A, Embu-Guaçu, SP, Brasil) e uma associação de Cloridrato de tiletamina e Cloridrato de zolazepam na dosagem de 0,2 ml/Kg/peso (Zoletil[®] 50, Virbac do Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Durante o procedimento, quando necessário, os animais receberam complementação anestésica com a metade da dosagem inicial. Em todo o momento operatório os animais foram hidratados com solução de Ringer Lactato, (Equiplex Indústria Farmacêutica, Goianea, GO, Brasil) via endovenosa, com o auxílio de butterfly nº 21

(Lamedid Comercial e Serviços Ltda., Buarueri, SP, Brasil) e equipo (Embramed Ind. e Com. De Produtos Hospitalares Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Os bloqueios perineurais foram realizados com Cloridrato de prilocaína a 3% com felipressina (Citanest[®] 3% com Octapressin, Dentsply Ind. e Com. Ltda., Catanduva, SP, Brasil).

Após a antissepsia do campo operatório com polivinilpirrolidona iodada (PVP-I) (Indústria Farmacêutica Rioquímica Ltda., São José do Rio Preto, SP, Brasil), os dentes de interesse foram isolados utilizando-se lençol de borracha (Madeitex, São José dos Campos, SP, Brasil). A abertura coronária foi realizada com o auxílio de ponta diamantada (K.G. Sorensen - Indústria e Comércio, São Paulo, SP, Brasil), acionadas em alta-rotação e refrigeradas em ar e água (Figuras 1 e 2). Após a odontometria, a polpa radicular foi removida com o auxílio de extirpa-nervos (Dentsply-Maillefer, Ind. e Com. Ltda., Petrópolis, RJ, Brasil) e o canal radicular submetido à instrumentação utilizando-se limas de primeira série (Dentsply-Maillefer, Ind. e Com. Ltda., Petrópolis, RJ, Brasil) (Figura 3), acompanhada de irrigações sucessivas de soro fisiológico (Equiplex, Indústria Farmacêutica, Martinópolis, SP, Brasil) e aspirações freqüentes. Os canais foram alargados até o limite canal-dentina-cemento, utilizando-se movimentos de alargamento e limagem, até a lima nº 40. Ao término do preparo biomecânico, o canal radicular foi secado com o uso de cones de papel absorvente (Tanari[®], Tanarim Ind. Ltda., Manacupuru, AM, Brasil) e obturado com cones de guta percha (Tanari[®], Tanarim Ind. Ltda., Manacupuru, AM, Brasil) e cimento a base de hidróxido de cálcio (Sealapex, Sybron Endo, Glendora, EUA) (Figura 4). Depois desse procedimento, a cavidade coronária recebeu condicionamento com ácido fosfórico a 37% (Vigodente S/A, Indústria e Comércio,

Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e, após lavagem e secagem da superfície dentária, selado com sistema adesivo (Prime & Bond 2.1, DENTSPLY Ind. e Com. Ltda., Petrópolis, RJ, Brasil) e resina composta (TPH Spectrum, DENTSPLY Ind. e Com. Ltda., Petrópolis, RJ, Brasil). Os dentes tratados foram radiografados utilizando-se filmes radiográficos (Dental Intraoral E-Speed Film, Kodak Comércio e Ind. Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil).



FIGURA 1- Abertura de um incisivo intermédio superior.



FIGURA 2- Aspecto de um pré-molar após a abertura coronária.



FIGURA 3- Preparo biomecânico do canal radicular.



FIGURA 4- Obturação do canal radicular.

4.3 Reimplante Dentário

Três dias antes do procedimento cirúrgico, os animais foram medicados com espiramicina associada ao metronidazol (Stomorgyl 10, Merial Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil) na dose de 2 mg/Kg de peso, por via oral, na dosagem de 1 comprimido por dia.

Para este procedimento, todos os animais receberam o mesmo protocolo de anestesia e cuidados trans-operatórios descritos no item 4.2. Após anestesia do animal, seguiu-se a extração dos elementos dentários. A antisepsia do campo operatório foi realizada com PVPI, seguido da sindesmotomia do dente de interesse (Figura 5) o qual foi luxado utilizando alavanca reta (J.O.N. Comércio de Produtos

Odontológicos, São Paulo, SP, Brasil) e em seguida, extraído com fórceps infantil nº 01 (Golgran Ind. e Com. De Instrumento Odontológico Ltda., São Caetano do Sul, SP, Brasil). Nos pré-molares, previamente à exodontia, as raízes foram seccionadas utilizando-se broca carbide lisa nº 2 (K.G. Sorensen – Indústria e Comércio, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 6), totalizando, para cada pré-molar, 2 raízes. Conseqüentemente, o número de raízes utilizadas para o reimplante foi de 24 raízes por cão, exceto aquele que apresentava agenesia dos segundos pré-molares que apresentou 18 raízes.

Uma vez realizada a extração dentária, os dentes foram fixados através da porção coronária em uma placa de cera utilidade, evitando o contato da porção radicular, e mantidos nessa posição em temperatura ambiente por 30 minutos (Figura 7).



FIGURA 5- Sindesmotomia do elemento dentário.



FIGURA 6- Odontosseção do 1º pré-molar inferior esquerdo.



FIGURA 7- Fixação dos elementos dentários após extração.

Decorridos 30 minutos, as raízes foram reimplantadas conforme os procedimentos descritos a seguir, sendo que, cada material foi utilizado em um animal diferente conforme explicitado na Tabela 1.

Tabela 1- Distribuição do material utilizado entre os cães

Cão	Material	
	Dentes superiores	Dentes inferiores
1	Sem material (Controle)	Plasma Pobre em Plaquetas (PPP)
2	Plasma Rico em Plaquetas (PRP)	Sem Material (Controle)
3	Plasma Rico em Plaquetas ativado por trombina bovina e cloreto de cálcio (PRP + TR)	Sem Material (Controle)
4	Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio (PRP)	Células-tronco associadas ao PRP ativado por cloreto de cálcio (CT + PRP)

Em todos os casos, os dentes anteriores reimplantados foram imobilizados aos dentes contíguos por meio de contenção com a utilização de um fio de aço ortodôntico de 0,014 polegadas (Dental Morelli, São José do Rio Preto, SP, Brasil) utilizando-se sistema adesivo e resina, seguido de fotopolimerização (Figura 8). Os dentes posteriores (pré-molares) tiveram sua porção coronária fixada com sistema adesivo e resina (Figura 9). As contenções dos dentes anteriores foram removidas 7 dias após o reimplante.



FIGURA 8- Contenção dos incisivos superiores e inferiores.



FIGURA 9- Aspecto de um 2º pré-molar após a contenção.

4.3.1 GRUPO I: Reimplante sem material (Controle)

Após os 30 minutos do período extra-alveolar, o alvéolo foi irrigado com soro fisiológico e a raiz reimplantada.

4.3.2 GRUPO II: Reimplante com Plasma Pobre em Plaquetas (PPP)

4.3.2.1 Preparo do Plasma Pobre em Plaquetas

Este preparo foi feito de acordo com o protocolo de Messoria et al. (2008) que é uma adaptação do protocolo de Sonnleitner et al. (2000), utilizando-se uma centrífuga laboratorial refrigerada (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha) e uma capela de fluxo laminar (Cabina de Fluxo Laminar Vertical Veco®, Veco do Brasil Indústria e Comércio de Equipamentos Ltda., Campinas, SP, Brasil) para a manipulação das amostras biológicas.

Após anestesia do animal, 10 ml do sangue periférico foi coletado da veia jugular do animal em uma seringa de polietileno de 20 ml contendo solução ACD-A (ácido citrato dextrose)- Fórmula "A" (JP Indústria Farmacêutica S/A, Ribeirão Preto, SP, Brasil) em uma proporção de 5:1. Após homogeneização por 5 minutos, uma amostra de 500 µL foi separada para a contagem de plaquetas. O sangue coletado foi inicialmente centrifugado em tubos à vácuo (Vacuplast, Huangyn, China) a 160 *g* por 20 minutos, à temperatura de 22°C (Figura 10). Após a primeira centrifugação, um ponto de 2.0 mm foi marcado abaixo da linha que divide as duas frações, sendo todo o conteúdo acima deste ponto pipetado e transferido para outro tubo a vácuo. A amostra foi submetida à nova centrifugação a 400 *g* por 15 minutos a 22°C,

resultando nos dois componentes, um localizado acima do tubo (Plasma Pobre em Plaquetas- PPP) e outro abaixo do tubo (Plasma Rico em Plaquetas- PRP) (Figura 11).

As plaquetas presentes no sangue periférico e no PPP e PRP foram contadas manualmente em câmara de Neubauer em um microscópio binocular (Olympus Corporation, Tokio, Japão) com a objetiva de 40x. Para a realização deste método, a amostra foi diluída em solução de Brecher, utilizando-se pipeta de Thoma para glóbulos vermelhos (NORMAX, Marinha Grande, Portugal). Neste animal, a contagem inicial de plaquetas do sangue periférico foi de 147.500 plaquetas/ μ l de sangue; de 52.500 plaquetas/ μ l de sangue para o plasma pobre em plaquetas e de 820.000 plaquetas/ μ l de sangue para o plasma rico em plaquetas.

Imediatamente antes do reimplante dentário, 200 μ l de PPP foi pipetado e colocado em um recipiente de plástico esterilizado, tipo "casulo" (Figura 12) e o material ativado com 10 μ l cloreto de cálcio a 10% (Aphoticário, Farmácia de Manipulação, Araçatuba, SP, Brasil) (0,05 ml para cada 1 ml de PPP). Após a irrigação do alvéolo com soro fisiológico, o material foi então levado ao alvéolo e o dente reimplantado.

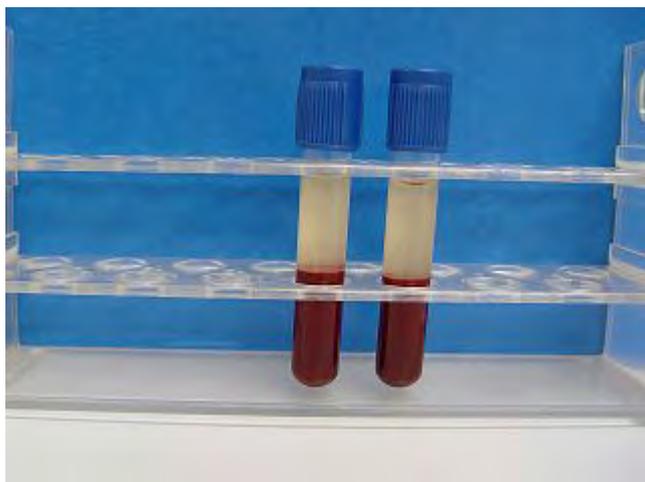


FIGURA 10- Separação das duas frações do sangue após a 1ª centrifugação.

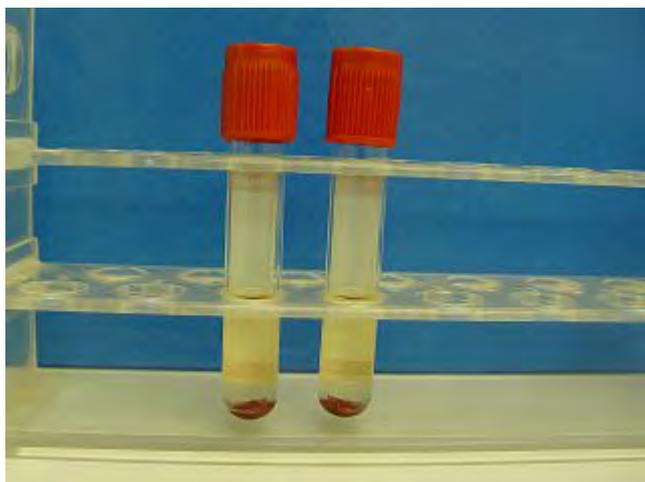


FIGURA 11- Obtenção do Plasma Pobre e Plaquetas (PPP) e Plasma Rico em Plaquetas (PRP) após 2ª Centrifugação.



FIGURA 12- Plasma pobre em plaquetas acondicionado em recipiente de plástico esterilizado.

4.3.3 GRUPO III: Reimplante com Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio (PRP)

4.3.3.1 Preparo do Plasma Rico em Plaquetas

Este preparo seguiu o mesmo protocolo descrito no item 4.3.2.1. Foi coletado 30 mL de sangue da veia jugular em uma seringa de polietileno de 60 ml solução ACD-A (ácido citrato dextrose)- Fórmula "A" em uma proporção de 5:1. Após a segunda centrifugação, a fração do Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) foi descartada, permanecendo a porção inferior do tubo, ou seja, o Plasma Rico em Plaquetas (PRP). Neste animal, foi observado um total de 192.500 plaquetas/ μ l de sangue para o sangue periférico e de 615.000 plaquetas/ μ l de sangue para o plasma rico em plaquetas.

Imediatamente antes do reimplante dentário, 200 μ l de PRP foi pipetado e transportado para um recipiente de plástico esterilizado, tipo "casulo" (Figura 13). A ativação deste material foi realizada com 10 μ l cloreto de cálcio a 10% (Aphoticário, Farmácia de Manipulação, Araçatuba, SP, Brasil) (0,05 ml para cada 1 ml de PRP). Após a irrigação do alvéolo com soro fisiológico, o material foi então levado ao alvéolo (Figura 14) e o dente reimplantado (Figura 15).



FIGURA 13- Plasma rico em plaquetas acondicionado em recipiente de plástico esterilizado.



FIGURA 14- Plasma rico em plaquetas colocado no interior do alvéolo.



FIGURA 15- Reimplante do elemento dentário.

4.3.4 GRUPO IV: Reimplante com Plasma Rico em Plaquetas ativado por trombina de origem bovina e cloreto de cálcio (PRP + TR)

O preparo do PRP seguiu o mesmo protocolo descrito no item 4.3.2.1. Foi coletado 30 mL de sangue da veia jugular em uma seringa de polietileno de 60 ml solução ACD-A (ácido citrato dextrose)- Fórmula "A" em uma proporção de 5:1. A contagem do sangue periférico foi de 177.500 plaquetas/ μ l de sangue e a contagem final do plasma rico em plaquetas foi de 715.000 plaquetas/ μ l de sangue. Neste grupo, a ativação do PRP foi realizada com trombina de origem bovina em pó (10.000 U) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) dissolvida em 10 mL de cloreto de cálcio a 10% (Aphoticário, Farmácia de Manipulação, Araçatuba, SP, Brasil). Um total de 28,58 μ l da mistura foi utilizada para a ativação do PRP (500 μ l de trombina e cloreto de cálcio para 3,5 ml de PRP) (Yamada et al., 2004). Após a ativação, o alvéolo foi irrigado com soro fisiológico e as raízes reimplantadas.

4.3.5 GRUPO V: Reimplante com Células-tronco associadas ao Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio (CT + PRP)

4.3.5.1 Coleta do material de medula óssea

Para este procedimento, o animal foi anestesiado com 0,05 ml/Kg/peso de Cloridrato de Xilazina (Calmium, União Química Farmacêutica Naconal S/A, Embu-Guaçu, SP, Brasil) e uma mistura de Cloridrato de tiletamina e Cloridrato de zolazepam na dosagem de 0,2 ml/Kg/peso (Zoetil[®] 50, Virbac do Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Um total de 2,5 mL de material foi aspirado da medula óssea da crista

do osso íliaco, utilizando uma agulha especial para punção da medula óssea (Komiyaishi, Japão) e seringa de polietileno de 20 mL associado a 1,5 ml de heparina sódica (Cristália, Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP) (Figura 16). O animal foi colocado em decúbito lateral direito, realizando-se, a seguir, a tricotomia e assepsia do local da punção. Para penetrar no espaço medular do osso íliaco, foi aplicada uma pressão manual moderada à agulha, girado-a e alternando os movimentos para direita e esquerda. Por meio de uma pressão negativa na seringa foi colhido o material da medula óssea.

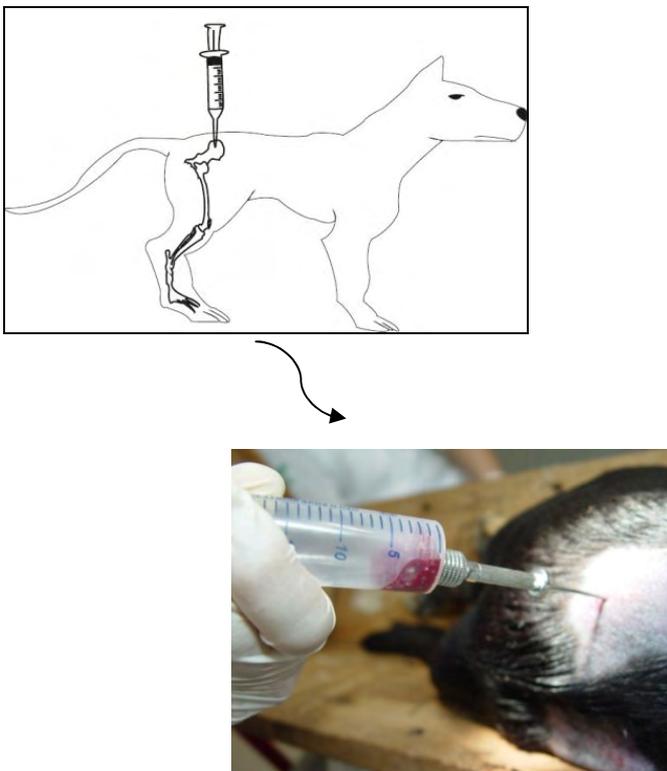


FIGURA 16- Diagrama e foto ilustrando a punção íliaca realizada para obtenção das células-tronco da medula óssea.

4.3.5.2 Separação das células-tronco derivadas da medula óssea do cão

Este procedimento seguiu a metodologia proposta por Csaki et al. (2007). O material coletado da medula óssea foi misturado com solução salina a 0,9% (Equiplex Ind. Farmacêutica, Martinópolis, São Paulo) na proporção 1:1, sendo posteriormente transferido para um tubo de centrifugação de 50 ml (Techno Plastics, Trasadingen, Suíça) contendo 15ml de Ficoll-PaqueTM Plus (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia) e submetido à centrifugação inicial a 400 *g* durante 30 minutos em temperatura de 20°C. Após esta etapa, a camada mononuclear obtida durante a centrifugação ou *buffy coat* (Figura 17) foi coletada e colocada em um novo tubo de 15 ml (Techno Plastics, Trasadingen, Suíça), no qual foi acrescida solução salina a 0,9%. Após esta etapa, seguiu-se mais uma centrifugação por 450 *g* durante 5 minutos em temperatura de 20°C, sendo que o sobrenadante resultante desta centrifugação foi descartado. As células foram lavadas 3 vezes em solução salina a 0,9% por meio de centrifugação em 1200 rpm por 6 minutos em temperatura de 20°C. O *pellet* formado (Figura 18) foi então ressuspense em 10 mL de meio Dulbecco's modificado por Eagle (DMEM) (Invitrogen Corporation, Grand Isle, Estados Unidos) para a contagem das células em câmara de Neubauer com a utilização do azul de tripano que permitiu diferenciar as células viáveis daquelas não viáveis (coradas) (Figura 19). Após a contagem das células, o material foi submetido a uma centrifugação de 1100 rpm por 5 minutos e o *pellet* formado foi ressuspense no Plasma Rico em Plaquetas, onde 200 µl contendo $3,08 \times 10^6$ células foi transportado ao recipiente de plástico tipo casulo, e ativado com cloreto de cálcio

como já descrito. O reimplante para este material seguiu o mesmo protocolo dos demais grupos.

Neste animal, foi coletado 50 mL de sangue da veia jugular em uma seringa de polietileno de 60 ml solução ACD-A (ácido citrato dextrose)- Fórmula "A" em uma proporção de 5:1. O preparo e a ativação do plasma rico em plaquetas seguiram o mesmo protocolo do item 4.3.2.1. Neste animal, a contagem inicial do sangue periférico foi de 147.500 plaquetas/ μ l de sangue, e a contagem final do plasma rico em plaquetas obtido foi de 710.000 plaquetas/ μ l de sangue.

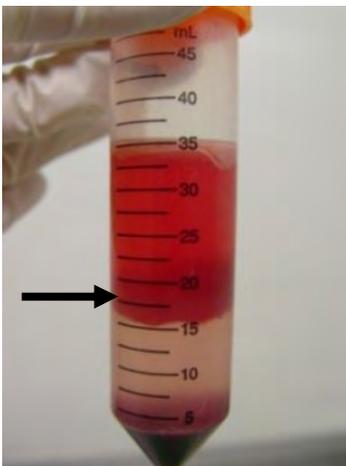


FIGURA 17- Separação das células por centrifugação utilizando Ficoll-Paque™. A seta indica a camada das células mononucleares (células-tronco).

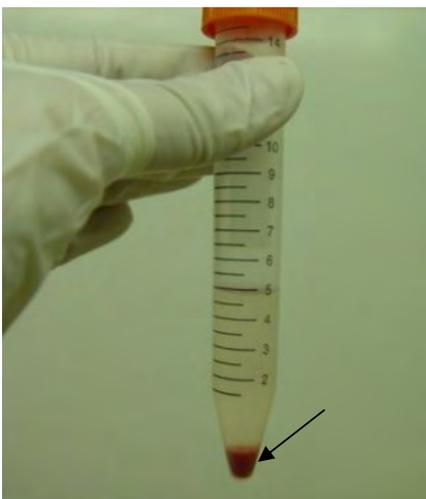


FIGURA 18- *Pellet* de células formado após a última centrifugação (seta).

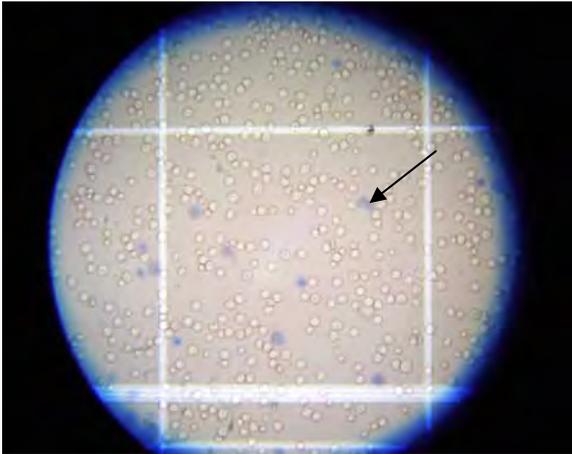


FIGURA 19- Contagem de células utilizando a câmara de Neubauer através da exclusão pelo teste de vitalidade com azul de Tripano (seta).

4.3.5.3 Caracterização celular através de citometria de fluxo

Após a coleta da medula óssea, as células da camada mononuclear foram avaliadas por meio de citometria de fluxo. Após a contagem em câmara de Neubauer, 5×10^5 células foram suspensas em 100 μL tampão fosfato citrato- PBS (pH 7,4). As células foram marcadas com anticorpos específicos conjugados a fluorocromos: Anti-CD90-canino (AbD Serotec, Oxford, Reino Unido) e identificado pelo secundário *Rabbit F(ab')₂ Anti-rat IgG* conjugado a ficoeritina-R (RPE) (AbD Serotec, Oxford, Reino Unido) e Anti-CD34-canino conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (AbD Serotec, Oxford, Reino Unido). As células foram analisadas no citômetro de fluxo modelo FACScalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, Estados Unidos) (Figura 20).



FIGURA 20- Citômetro de fluxo utilizado para a análise de caracterização das células da medula óssea.

4.4 Cuidados pós-operatórios

Após o reimplante dentário, todos os animais foram submetidos à antibioticoterapia com uso de espiramicina associada ao metronidazol (Stomorgyl 10, Merial Saúde Animal Ltda.) na dose de 2 mg/Kg de peso, 1 vez ao dia durante 3 dias após a cirurgia. Os animais também foram administrados com cloridrato de tramadol (Tramal®, Laboratórios Pfizer Ltda., Guarulhos-SP) na dose de 2 mg/Kg, 1 vez ao dia durante seis dias após a cirurgia. Nesta fase, os animais foram alimentados com ração comercial adicionada ao leite durante 15 dias.

Decorrido o período experimental de 120 dias, os animais foram anestesiados seguido de aprofundamento com uma solução de Tiopental Sódico a 2,5% (Thiopentax, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil) na dose de 25 mg/Kg de peso para que seja praticada a eutanásia por perfusão realizada após a dissecação bilateral das carótidas e jugulares. Uma injeção, via

artéria carótida, de uma solução de 45 g de cloreto de sódio P.A (SIGMA Chemical CO., Steinheim, Alemanha) diluído em 5 litros de água destilada foi realizada para retirar todo o sangue do animal. Em seguida, da mesma forma, via carótida, injetou-se 3 litros de formol para auxiliar na fixação tecidual. As peças de interesse foram separadas, fixadas em solução formalina a 10% (Água Régia Química, Araçatuba, SP, Brasil) e descalcificadas em solução de ácido fórmico (Vetec Química Fina Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e citrato de sódio (Vetec Química Fina Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil), segundo o protocolo de Morse (1945).

Após o período de descalcificação, os espécimes foram incluídos em parafina (Merck, Darmsdadt, Alemanha), cortados serialmente no sentido longitudinal vestibulo-lingual com 6 micrômetros de espessura para a análise histológica e imuno histoquímica.

4.5 Análises Histomorfológica e Histomorfométrica

Para a análise histológica, as peças foram coradas pela hematoxilina de Harris e eosina aquosa e pelo Tricrômio de Masson e analisadas com auxílio de microscópio óptico (Microscópio Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Para a análise descritiva dos resultados, avaliou-se os 2/3 terço médios radiculares dos espécimes, observando-se a inserção ou não das fibras periodontais, presença ou não de reabsorções radiculares e ósseas e presença ou não de anquilose, 120 dias após o reimplante dentário.

Para a análise histomorfométrica, foram selecionados 12 cortes corados pela técnica H.E., representativos de cada grupo. A captação das imagens foi feita em

uma câmera digital (Leica DFC 500, Leica, Wetzlar, Alemanha) acoplada ao microscópio óptico (Leica DM 4000 B, Leica, Wetzlar, Alemanha) conectado ao computador utilizando o *Software Leica QwinPlus* em um aumento de 2,5X e armazenadas como figuras (tif 24). Como não foi possível capturar a porção radicular de interesse em uma mesma imagem devido ao tamanho das raízes, as imagens foram unidas utilizando programa de editor de fotos (Corel Drawn X3, Corel Corporation, Versão 13.0.0.739).

As imagens gravadas foram transferidas para o programa ImageLab 2000 (Diracon Bio Informática Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brasil) para a quantificação das áreas de reabsorção e anquiose (PANZARINI et al., 2005). Inicialmente, a área total correspondente à raiz era selecionada (Figura 21) e os dados armazenados em planilhas, contendo a área total e a porcentagem da região (Figura 22). Posteriormente, as áreas de reabsorção de superfície (Figura 23), reabsorção por substituição (Figura 24) e reabsorção inflamatória (Figura 25) foram selecionadas e os dados armazenados em planilhas. Para a quantificação das áreas de anquiose, foi utilizado a medida do perímetro total da superfície radicular e posteriormente, o perímetro correspondente à região de anquiose. Para a identificação das áreas de reabsorção e de anquiose, as imagens obtidas foram comparadas com os cortes histológicos no microscópio. Os dados foram transferidos para o programa Excel 1.4 para a realização da análise estatística.

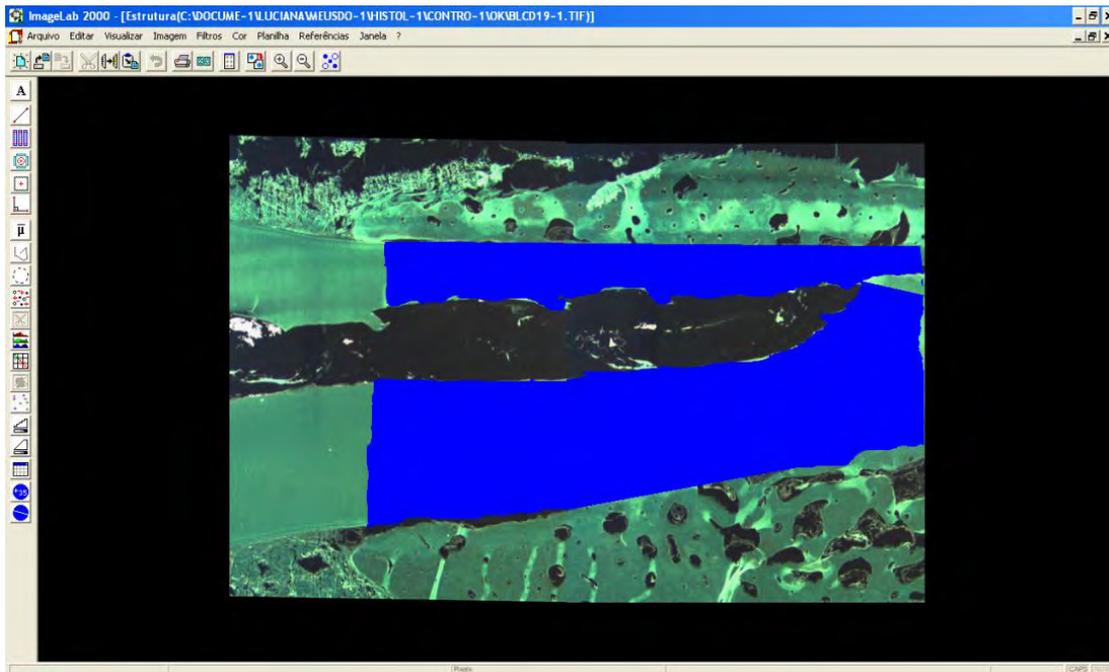


FIGURA 21- Área total radicular selecionada para quantificação.

Estrutura(C:\DOCLIME-1\1\LICIANAMFUSDO-1\HISTOL-1\CONTRO-1\OKBILCD19-1.TIF)													
B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
4	Largura:	Altura:		%do respões:									
5	800	536		em relação a		0,4%							
6				área total da imagem.									
7				Densidade	B	56,817							
8	Largura:	Altura:		óptica média	G	68,650							
9	1,000000	1,000000		das áreas	B	61,995							
10				marcadas	Média	62,518							
11	MORFOMETRIA												
12	Área	Perímetro	Fator de forma	ABSORÇÃO DE COR			Densidade	DIÂMETROS			CENTRO DE MASSA		
13				R	G	B	do estrutura	Diâm. Transv.	Diâm. Maior	Diâm. Menor	X	Y	
14	3	3	0	3	3	3	3	0	3	3	0	0	Número:
15	1602,000	524,995	0,000	91181,779	109977,681	99299,712	168,860	0,000	371,325	22,038	0,000	0,000	Soma:
16	534,000	174,998	#DIV/0!	30393,926	36659,227	33099,904	56,287	#DIV/0!	123,725	7,346	#DIV/0!	#DIV/0!	Média:
17	850,049	235,675	#DIV/0!	48729,053	58778,165	52199,036	13,777	#DIV/0!	187,698	5,527	#DIV/0!	#DIV/0!	Desvio Padrão:
18	1515,000	446,368	0,000	86625,828	104484,094	93316,055	65,793	0,000	340,325	13,038	0,000	0,000	Valor Máximo:
19	15,000	21,657	0,000	545,769	575,769	700,385	40,487	0,000	8,000	2,000	0,000	0,000	Valor Mínimo:
20	961,901	286,686	#DIV/0!	55140,989	66512,398	59067,564	15,590	#DIV/0!	212,384	6,255	#DIV/0!	#DIV/0!	Significância 5%:
21	1264,155	350,486	#DIV/0!	72467,711	87412,310	77628,117	20,488	#DIV/0!	279,121	8,220	#DIV/0!	#DIV/0!	Significância 1%:
22													
23													
24	MORFOMETRIA												
25	Área	Perímetro	Fator de forma	R	G	B	Densidade	Diâm. Transv.	Diâm. Maior	Diâm. Menor	X	Y	Borda
26	15,000	21,657		545,769	575,769	700,385	40,487	8,000	2,000				Não
27	1515,000	446,368		86625,828	104484,094	93316,055	62,580	340,325	13,038				Não
28	72,000	56,971		4010,182	4917,818	5283,272	65,793	23,000	7,000				Não
29													
30													
31													
32													
33													
34													
35													
36													
37													

FIGURA 22- Planilha contendo os valores referentes à área e a porcentagem.

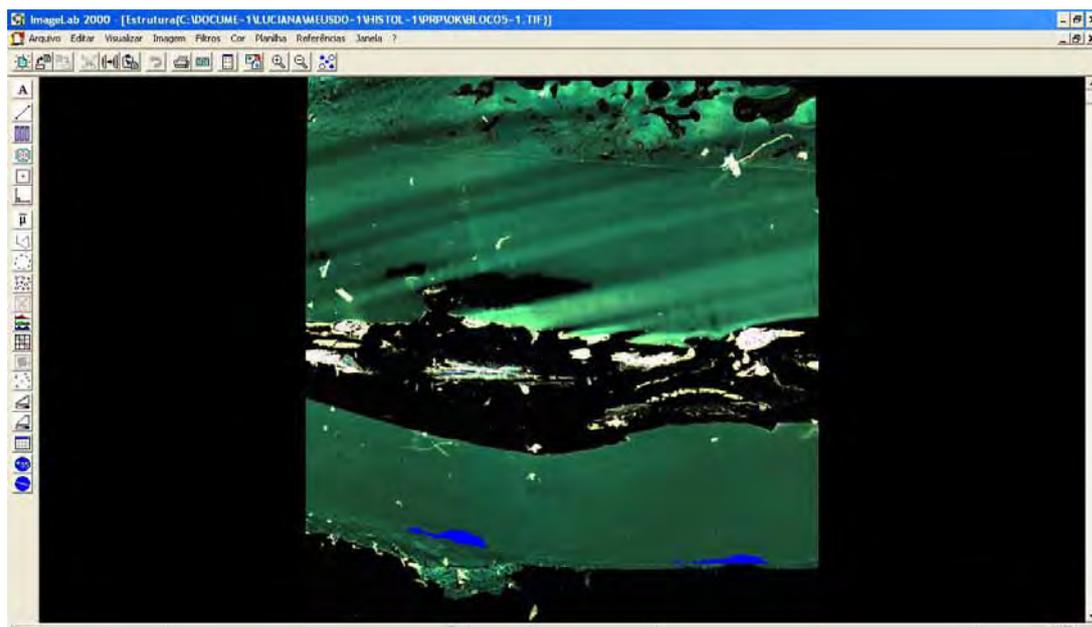


FIGURA 23- Área de reabsorção de superfície selecionada para quantificação.

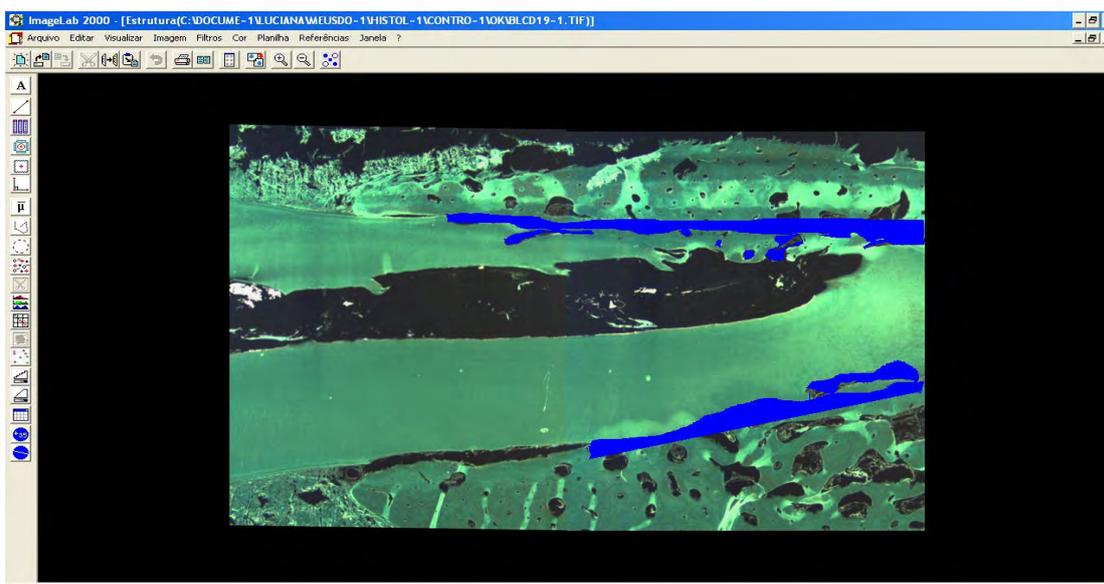


FIGURA 24- Área de reabsorção por substituição selecionada para quantificação.

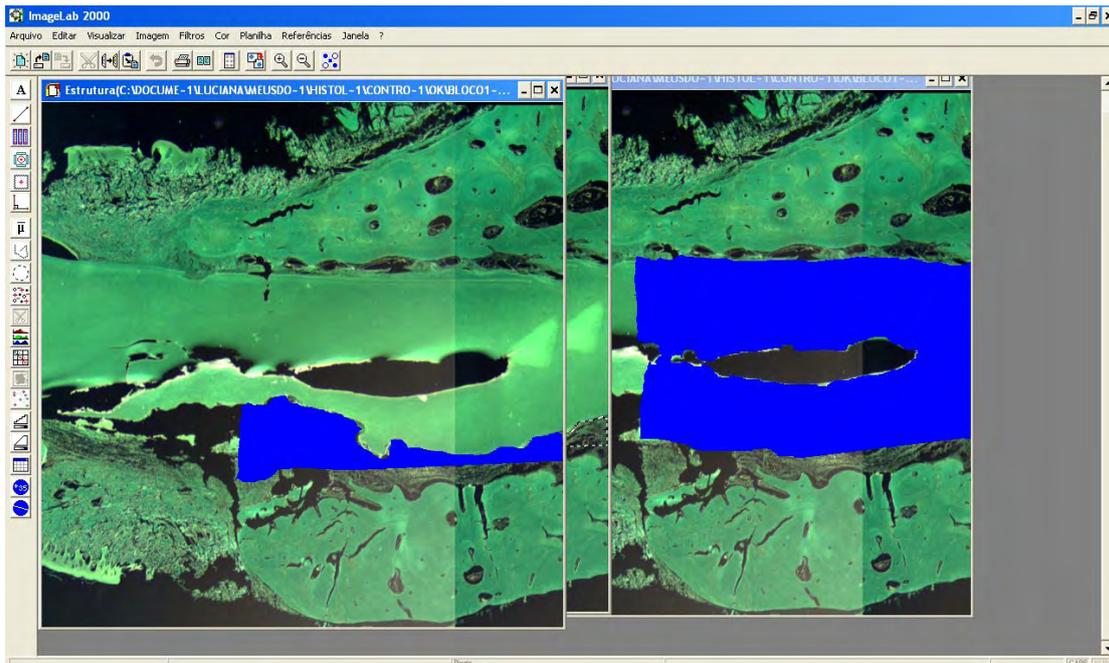


FIGURA 25- Área de reabsorção inflamatória selecionada para quantificação (esquerda) e área total radicular selecionada (direita).

4.6 Análise de Imuno Histoquímica

Para a análise de Imuno histoquímica, o processamento laboratorial dos cortes foi o mesmo realizado para a análise histológicas. Após o corte, os tecidos foram preparados em lâminas silanizadas (EasyPath, São Paulo, SP, Brasil) e os cortes preparados em uma seqüência de soluções de álcool e xilol. Após, as lâminas foram imersas em solução de água oxigenada (Merck, Darmsdadt, Alemanha) e PBS por 60 minutos e em solução tampão fosfato-citrato de sódio (Merck, Darmsdadt, Alemanha) durante 20 minutos, em temperatura de 55°C e durante 20 minutos em temperatura ambiente. A seguir, as lâminas foram bloqueadas em solução de leite desnatado por 20 minutos e o tecido foi incubado *overnight* com o anticorpo primário anti-osteopontina (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) e anti-TRAP (fosfatase ácido tartarato resistente) (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). As peças foram então lavadas e incubadas com o

anticorpo secundário biotinilado *rabbit anti-goat* por 30 minutos (1:200, Jackson Immuno Research Laboratory, USA). Os tecidos foram contramarcados utilizando-se o complexo avidina-biotina (Vectastain® Elite ABC, Vector, Burlingame, CA, Estados Unidos) e depois corados em uma solução substrato de peroxidase por 10 minutos (DAKO Cytomation, Kioto, Japão). Os tecidos foram contracorados com hematoxilina de Harris. Todas as amostras foram acompanhadas por um controle negativo.

As lâminas foram avaliadas utilizando-se microscópio óptico (Leica DM 4000 B, Leica, Wetzlar, Alemanha) em um aumento de 10 x, analisando-se os 2/3 médios radiculares dos espécimes. Foram observadas as marcações correspondentes às células e matriz do osso, ligamento periodontal e superfície dentária. Para a quantificação dessas imunomarcações, os seguintes escores foram utilizados:

0. Sem marcação
1. Marcação leve
2. Marcação moderada
3. Marcação intensa

4.7 Análise Estatística

Os resultados foram avaliados com o auxílio do programa Bioestat, versão 5.0 (AYRES; AYRES JUNIOR, 2007). A análise estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA) e o teste *post-hoc* de Tukey para as comparações individuais entre os grupos, utilizando-se nível de significância de 5%.

5 Resultado

5.1 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA

Os resultados obtidos foram descritos, após a análise qualitativa dos 2/3 médios radiculares dos cortes, onde as seguintes estruturas foram observadas: ligamento periodontal, cimento, dentina e parede óssea alveolar. Os resultados histomorfológicos serão descritos em função das ocorrências observadas nos diferentes grupos experimentais após 120 dias do reimplante.

GRUPO I (Controle)

Neste grupo, os espécimes que apresentavam dentina e cimento com integridade, mostravam a presença de cimento secundário (Figuras 26 e 27) sobre essas estruturas. Nesses casos, o espaço do ligamento periodontal era ocupado por feixes de fibras colágenas, sendo que, em alguns espécimes, áreas com discretas neoformações ósseas puderam ser observadas (Figura 28). Em alguns desses espécimes, o ligamento periodontal apresentou-se relativamente organizado e a parede óssea alveolar mostrava-se com integridade (Figura 29).

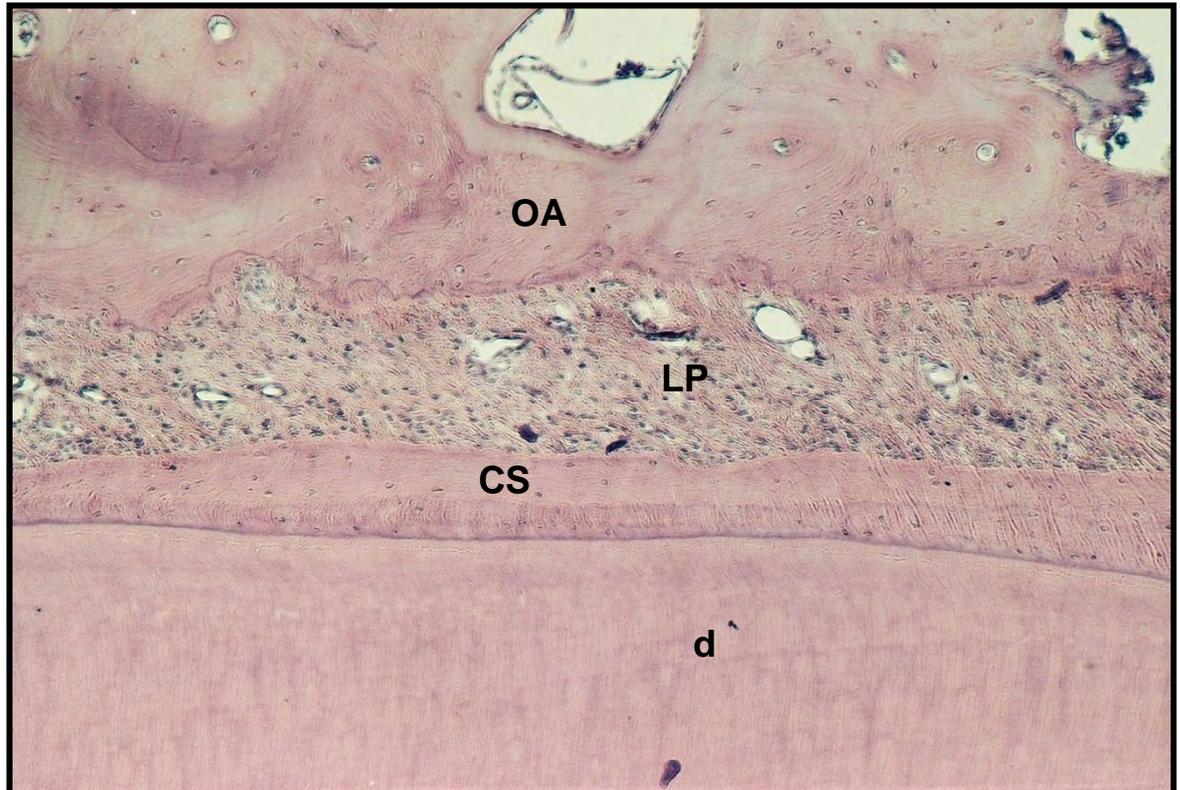


FIGURA 26- Grupo I (Controle). Camada de cimento secundário (CS) sobre dentina e cimento íntegros. H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina.

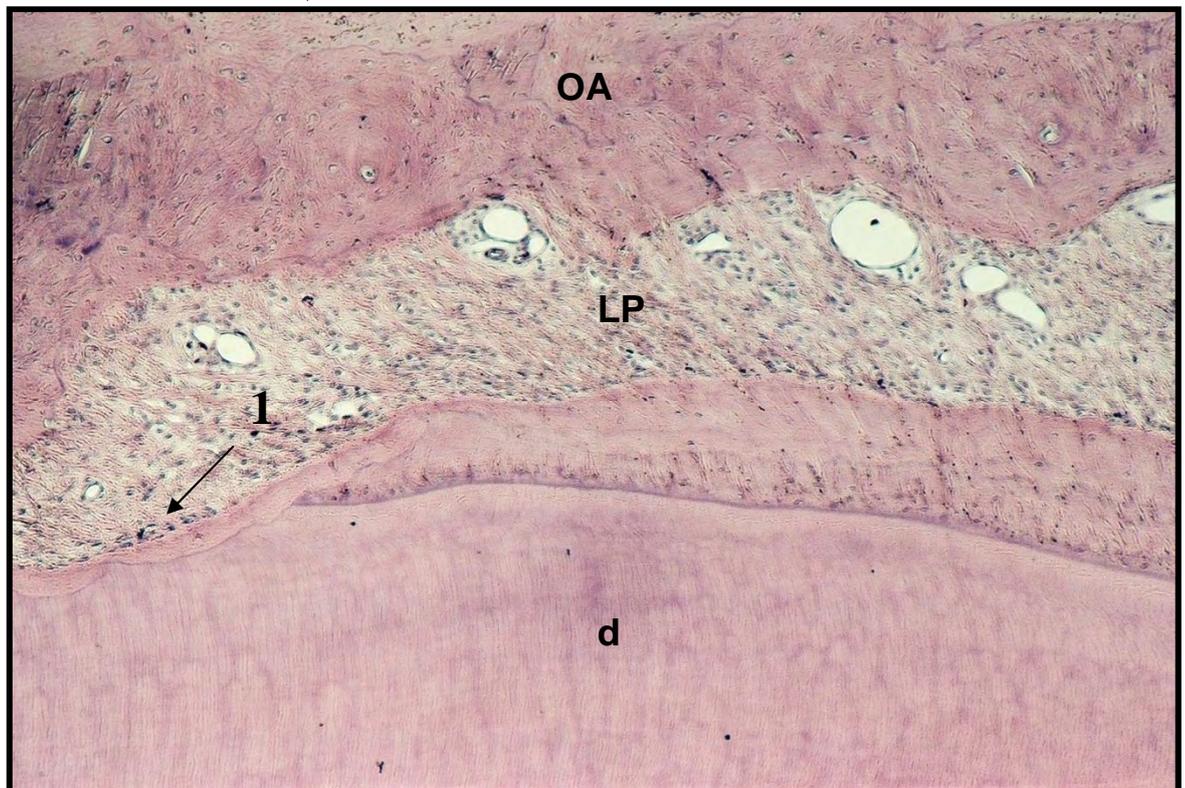


FIGURA 27- Grupo I (Controle). Área de reabsorção de superfície com tecido cementário neoformado (1). H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina.

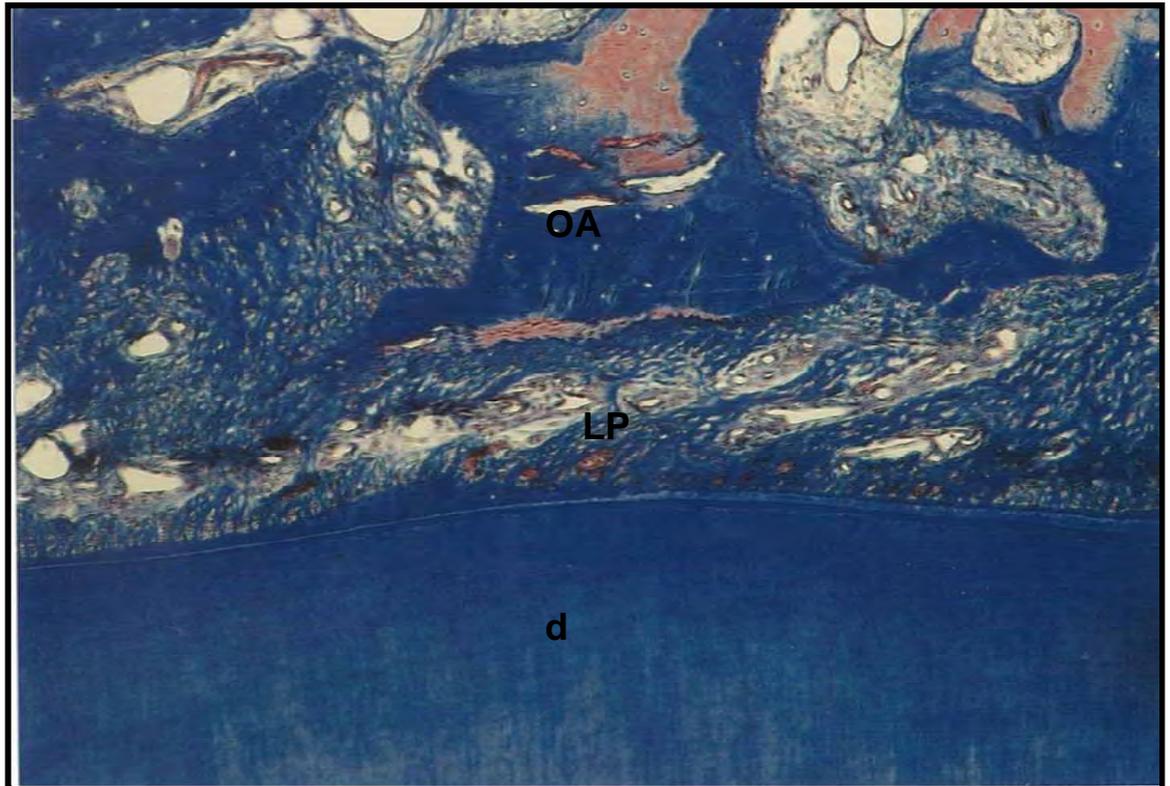


FIGURA 28- Grupo I (Controle). Ligamento periodontal (LP) com feixes de fibras colágenas e áreas com discretas formações ósseas. Tricrômio de Masson, original 63X. OA=Osso Alveolar; d=dentina.

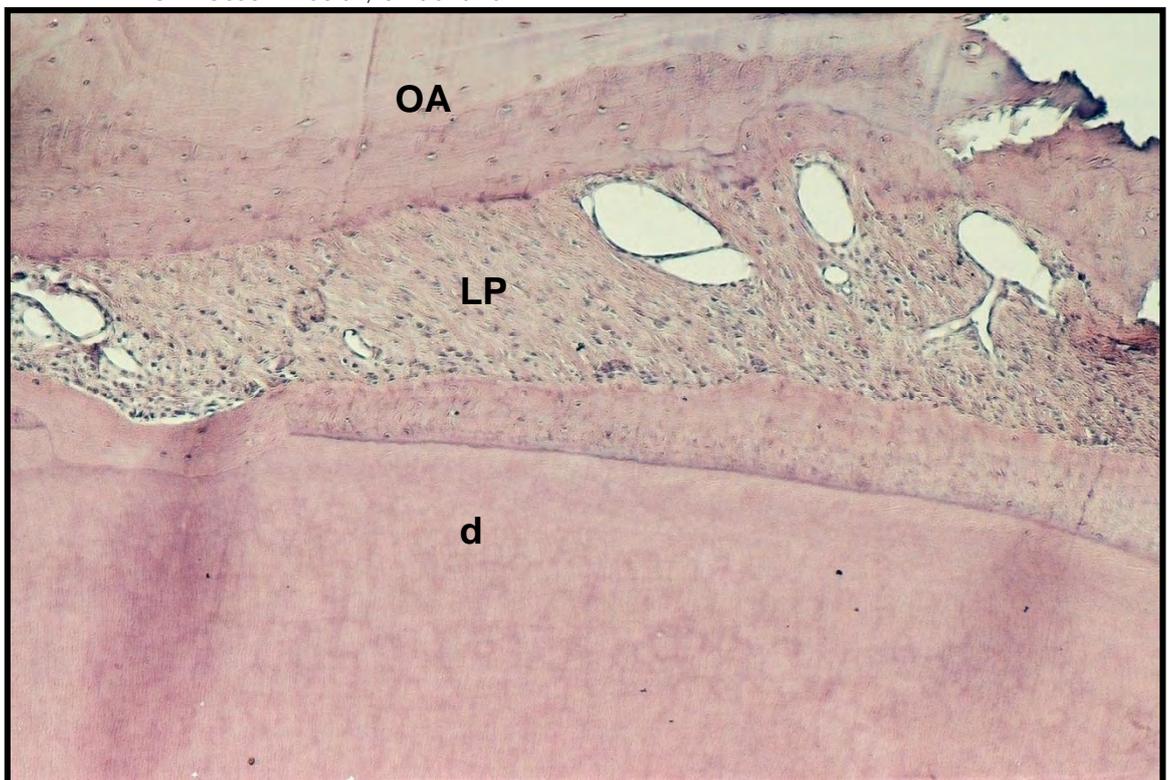


FIGURA 29- Grupo I (Controle). Ligamento periodontal (LP) relativamente organizado. H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; d=dentina.

Em outros espécimes, notou-se junto ao cimento e dentina reabsorvida, a presença de tecido conjuntivo pouco vascularizado com discreto número de fibroblastos (Figura 30).

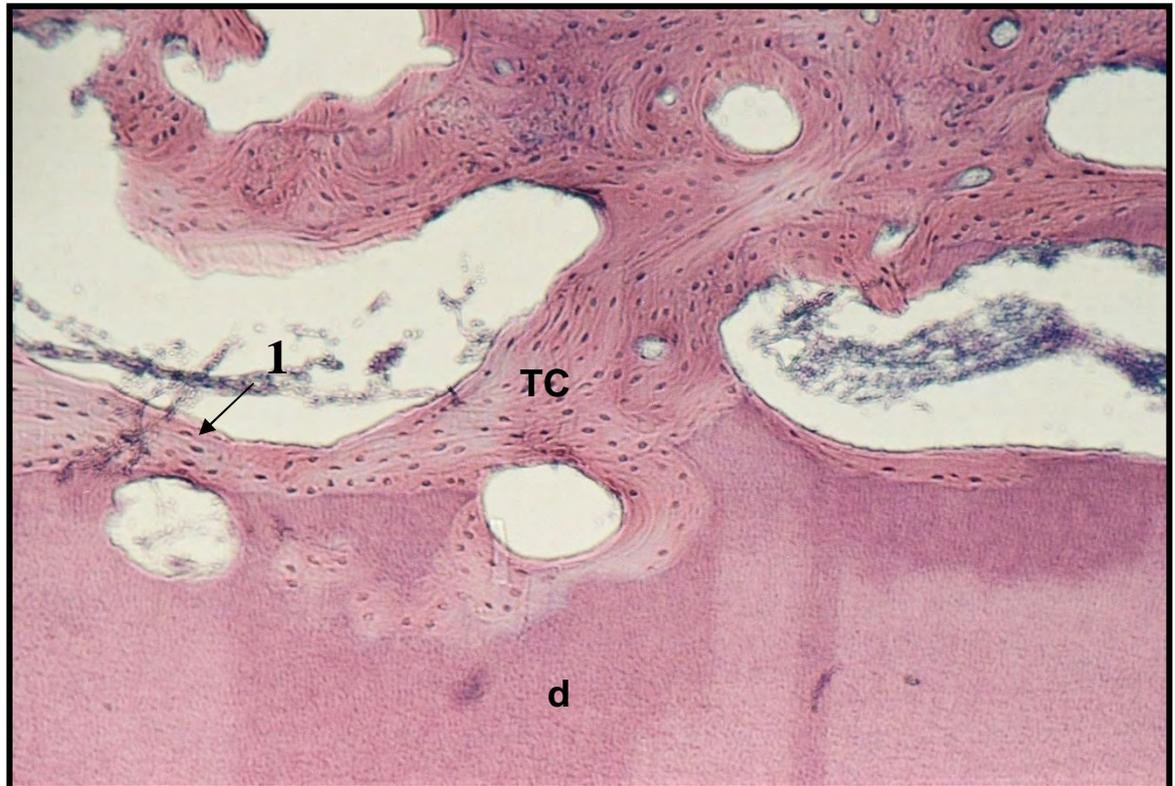


FIGURA 30- Grupo I (Controle). Áreas de dentina e cimento (1) reabsorvida com a presença de tecido conjuntivo (TC) pouco vascularizado. H.E., original 63X. d=dentina.

Também foram observados, neste grupo, alguns espécimes com o tecido ósseo neoformado praticamente em contato com a superfície da dentina e do cimento (Figura 31). Apresentando também, extensas áreas com reabsorção cimento-dentinária que se achavam ocupadas por tecido ósseo neoformado (Figura 32). Em alguns casos, foram evidenciadas, ao lado da reabsorção, pequenas áreas com cimento íntegro (Figura 33).

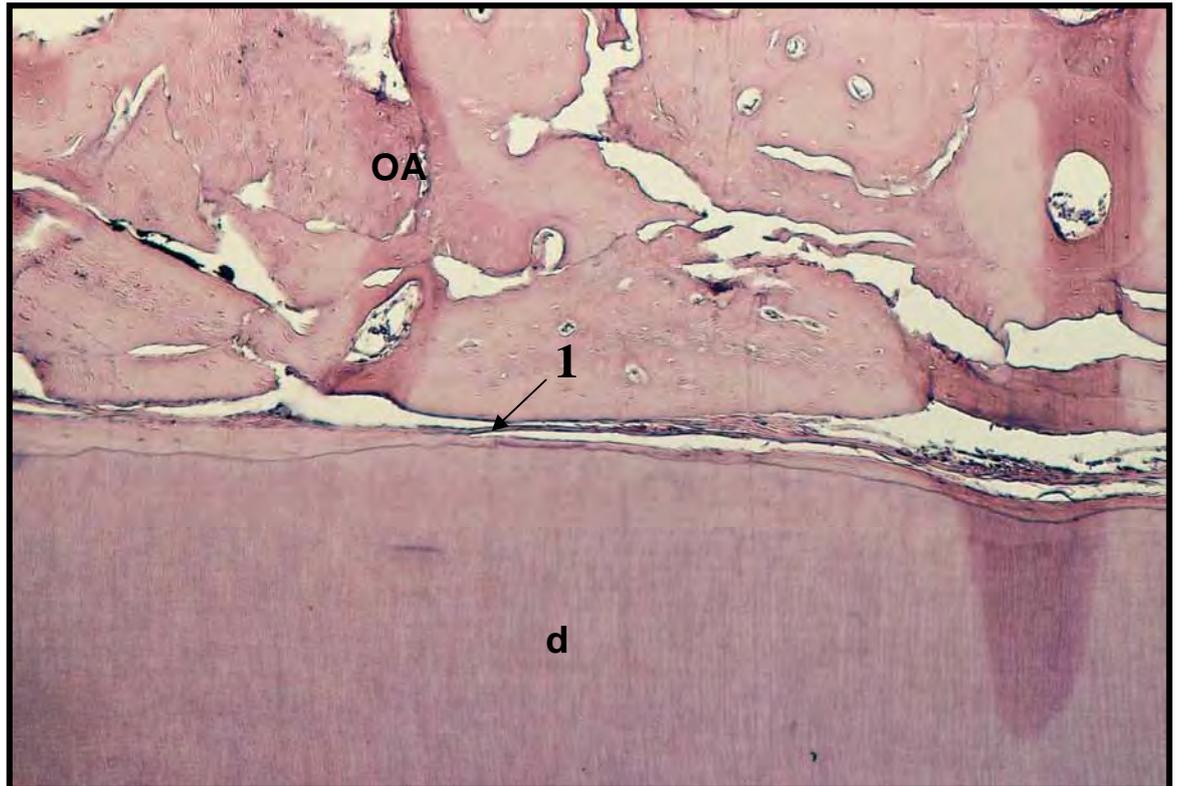


FIGURA 31- Grupo I (Controle). Parede óssea praticamente em contato com dentina ou cimento (1). H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; d=dentina.

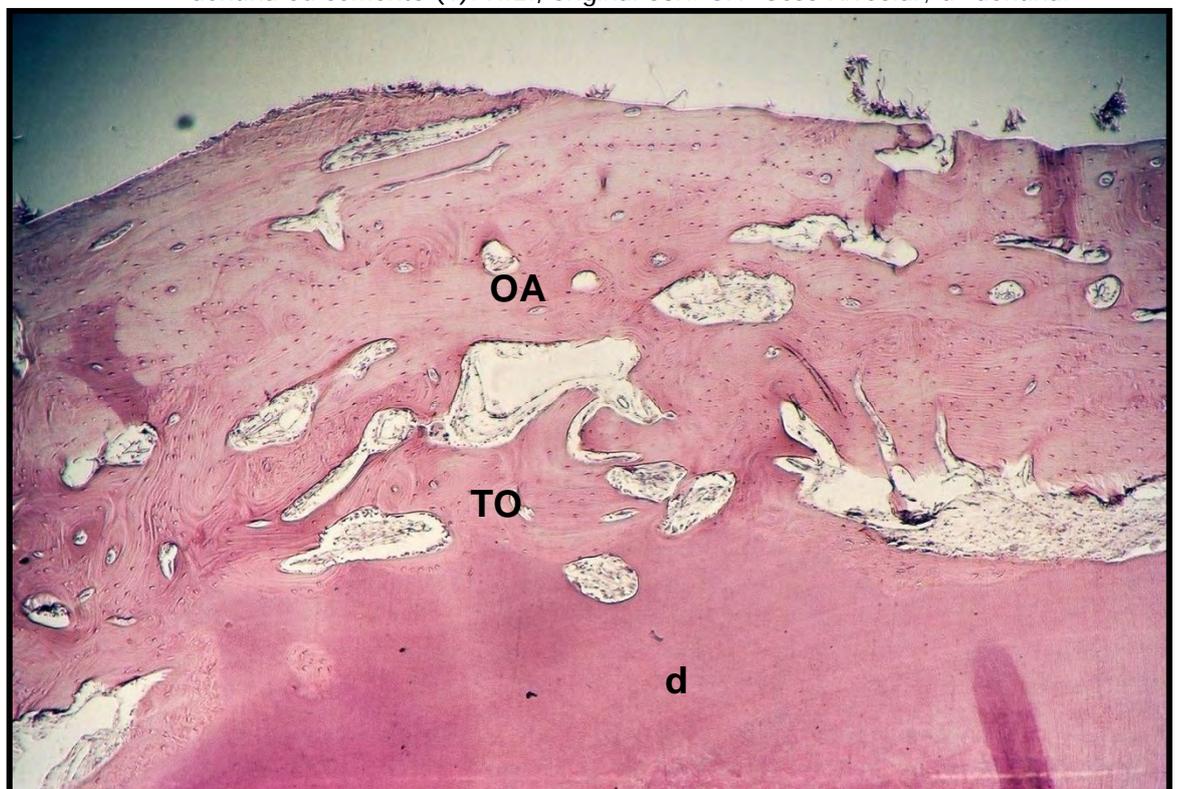


FIGURA 32- Grupo I (Controle). Extensas áreas de reabsorção por substituição com formação de tecido ósseo (TO). H.E., original 25X. OA=Osso Alveolar; d=dentina.

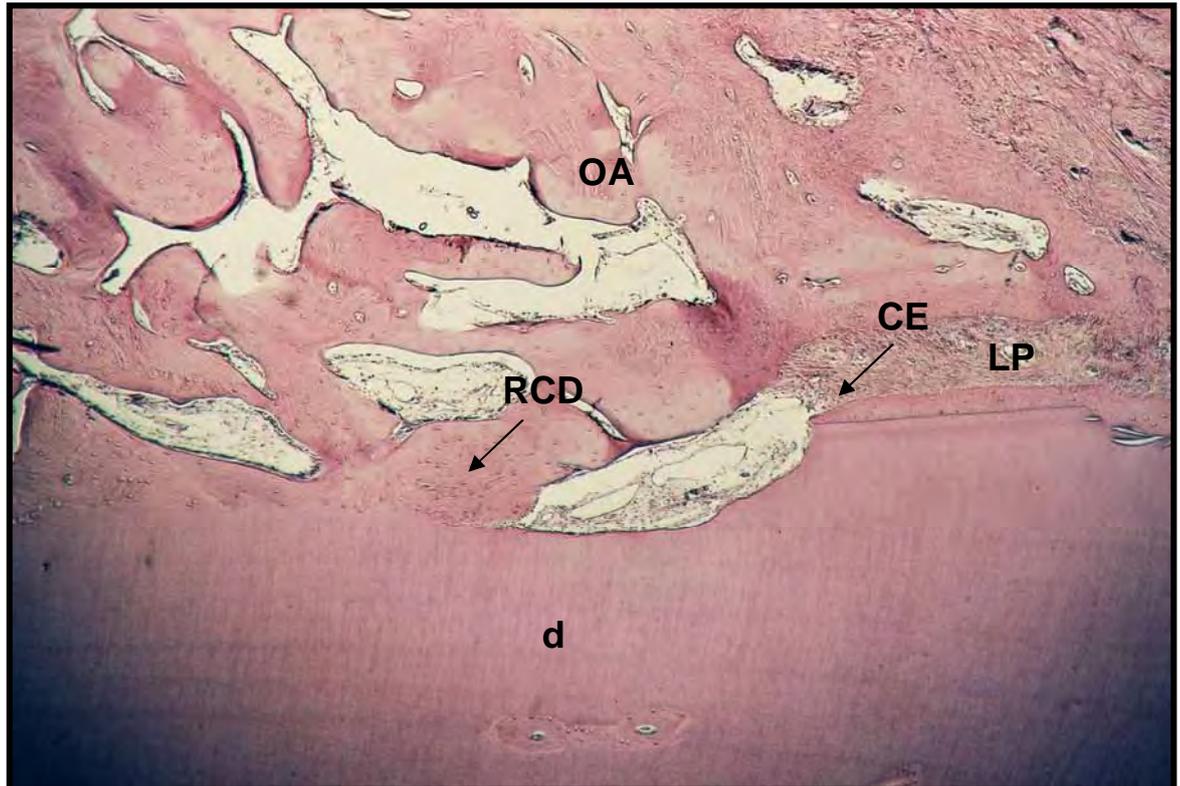


FIGURA 33- Grupo I (Controle). Áreas de reabsorção cimento-dentinária (RCD) e pequenas áreas com cimento íntegro (CE). H.E., original 25X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina.

GRUPO II (Reimplante com Plasma Pobre em Plaquetas)

A grande maioria dos espécimes que pertenciam a este grupo apresentou discretas áreas de reabsorção ocupada por cimento secundário (Figura 34). Em dois dos espécimes, evidenciou-se o cimento praticamente com integridade (Figura 35), apresentando apenas pequenos pontos de reabsorção cimento-dentinária. Feixes de fibras colágenas foram observadas entre a superfície cementária e a parede óssea alveolar, com discreta neoformação óssea (Figura 36).

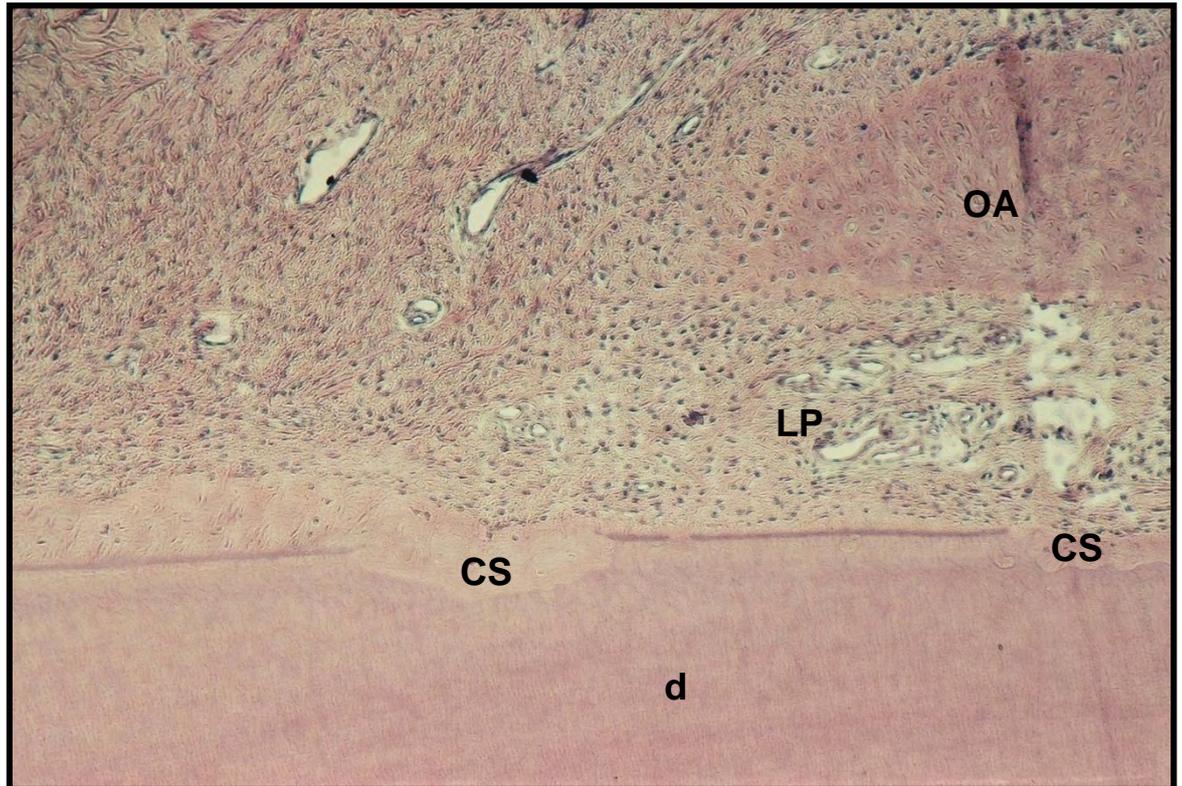


FIGURA 34- Grupo II (Plasma Pobre em Plaquetas). Discretas áreas de reabsorção de superfície ocupada por cimento secundário (CS). H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina.



FIGURA 35- Grupo II (Plasma Pobre em Plaquetas). Cimento mostrando-se íntegro, com pequenas áreas de reabsorção de superfície (1). H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina.

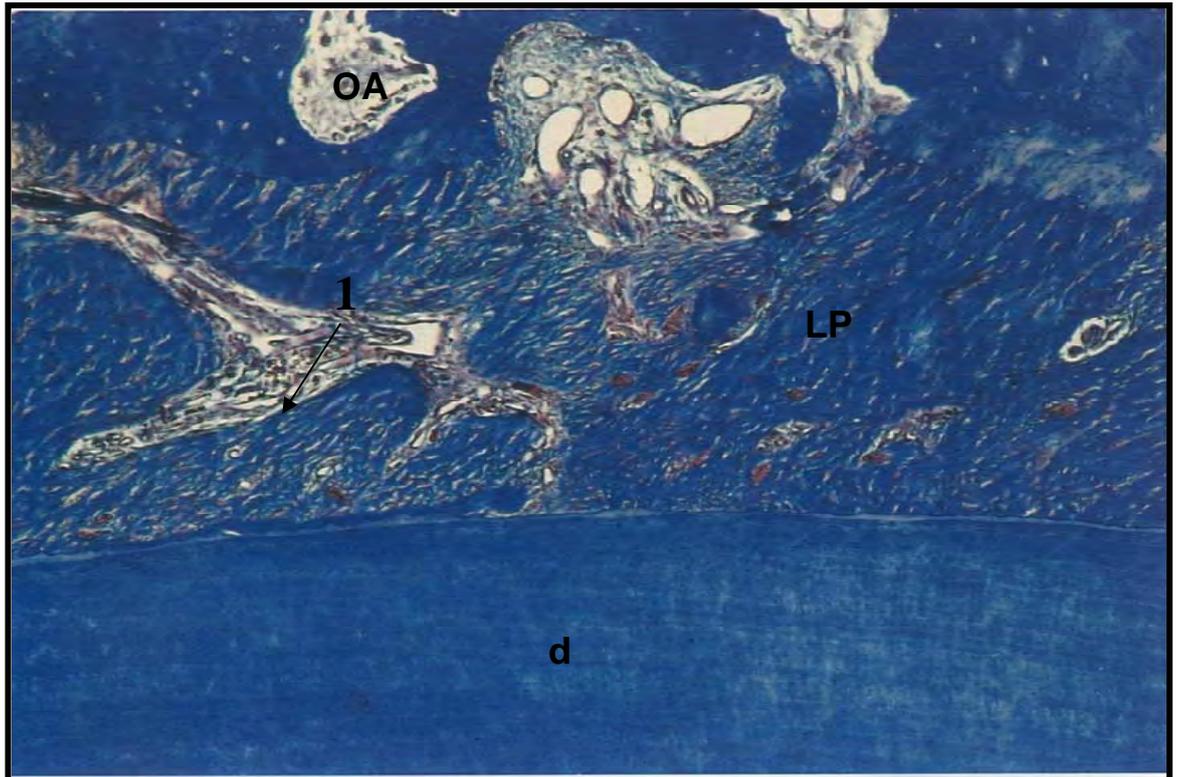


FIGURA 36- Grupo II (Plasma Pobre em Plaquetas). Presença de fibras colágenas (1) com discreta neoformação óssea. Tricrômio de Masson, original, 63X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina.

Em quatro espécimes, observou-se espessa camada de cimento secundário sobre a superfície do dente (Figura 37), ocasionando a diminuição do espaço periodontal. Em um dos casos, o tecido ósseo neoformado ocupava praticamente o espaço periodontal (Figura 38).

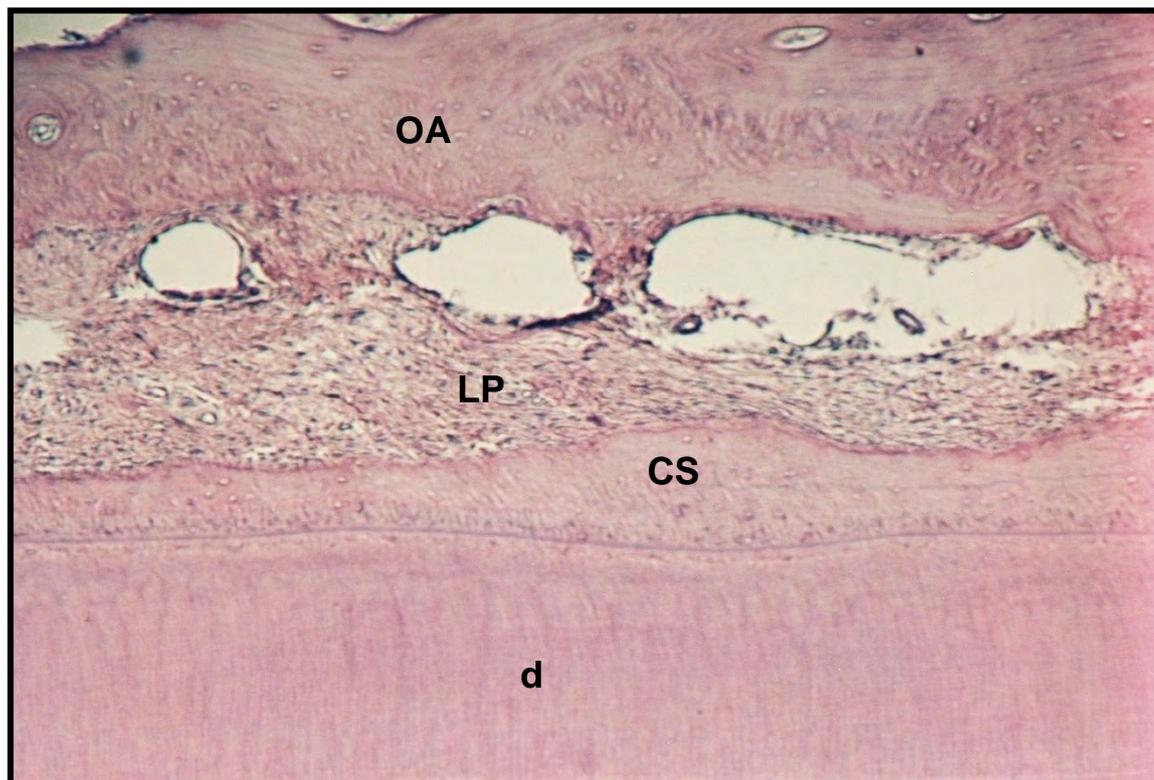


FIGURA 37- Grupo II (Plasma Pobre em Plaquetas). Espessa camada de cimento secundário (CS) sobre a superfície radicular. H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina.

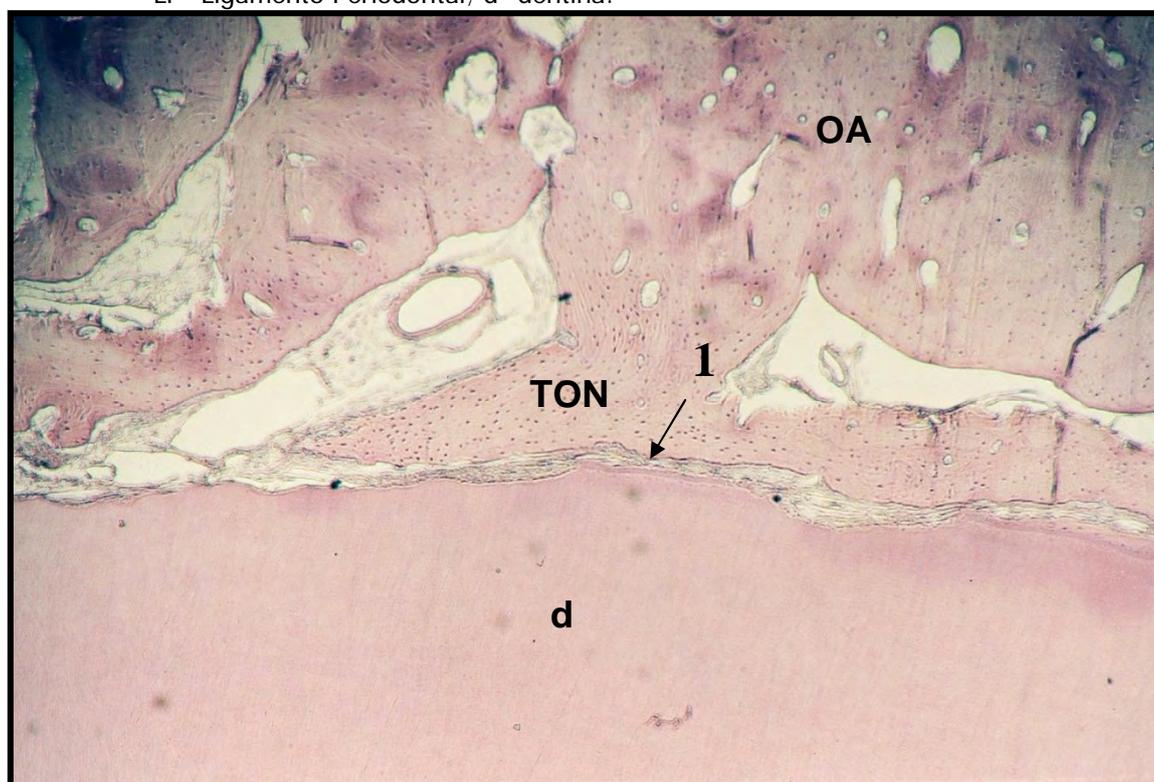


FIGURA 38- Grupo II (Plasma Pobre em Plaquetas). Tecido ósseo neoformado ocupando o espaço do Ligamento Periodontal (1). H.E., original 25X. OA=Osso Alveolar; d=dentina.

Nos espécimes onde foi observado neoformação óssea ocupando o espaço do ligamento periodontal, também foi evidenciado, em algumas regiões, extensas áreas de reabsorção cemento-dentinária, ocupadas por tecido conjuntivo (Figura 39 e 40). Em um desses espécimes, evidenciou-se extensas áreas de reabsorção dentinária (Figura 41).

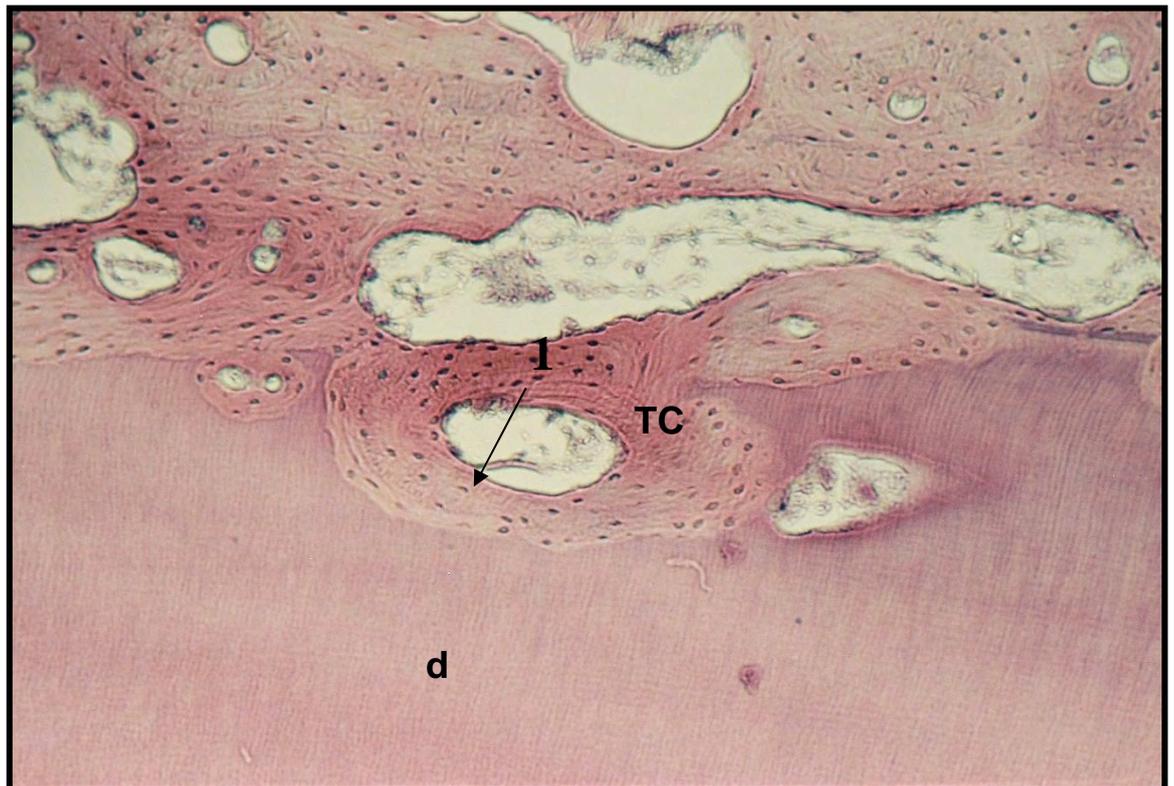


FIGURA 39- Grupo II (Plasma Pobre em Plaquetas). Extensas áreas de reabsorção cemento-dentinária (1) ocupada por tecido conjuntivo (TC). H.E., original 63X. d=dentina.

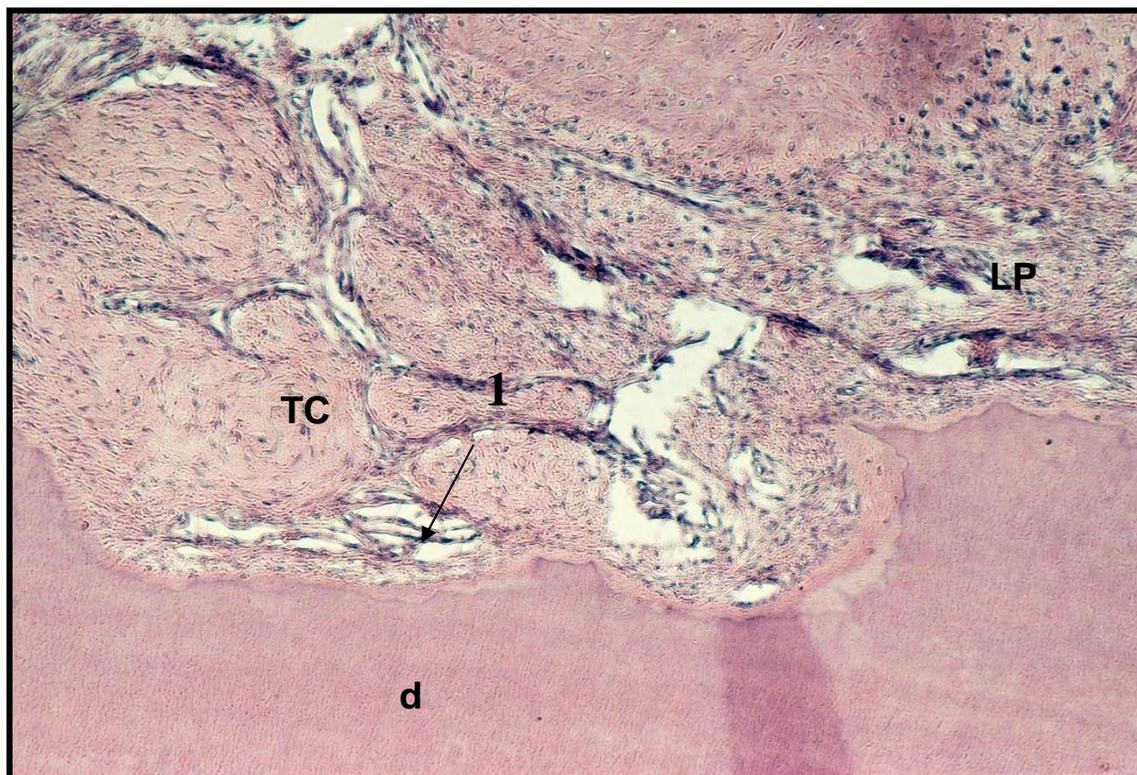


FIGURA 40- Grupo II (Plasma Pobre em Plaqueta). Áreas de reabsorção (1) ocupada por tecido conjuntivo (TC). H.E., original 63X. LP=Ligamento Periodontal; d=dentina.

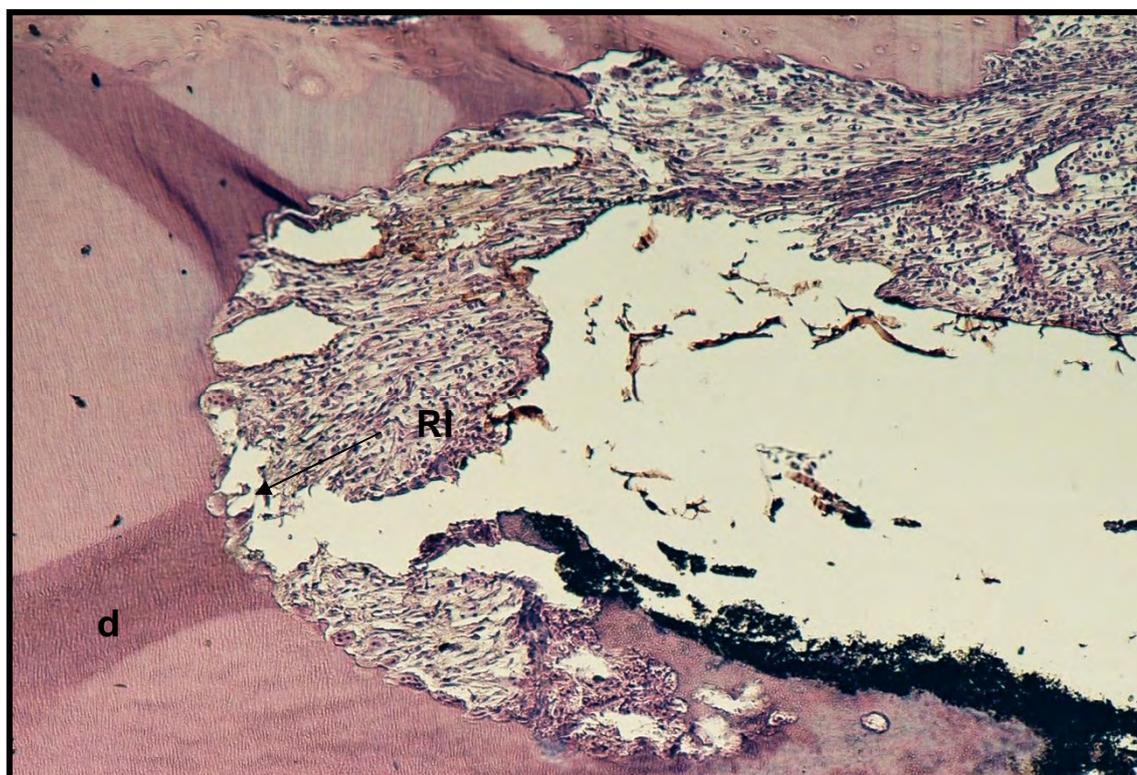


FIGURA 41- Grupo II (Plasma Pobre em Plaqueta). Área com extensa reabsorção inflamatória (RI) com conseqüente destruição da superfície dentinária. H.E., original 63X. d=dentina.

GRUPO III (Reimplante com Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio)

Este grupo foi marcado com áreas de reabsorção superficiais e também por extensas áreas de osso neoformado ocupando o espaço do ligamento periodontal. As reabsorções inflamatórias foram raras neste grupo.

Em alguns casos, o espaço do ligamento periodontal encontrava-se ocupado parcialmente por cimento secundário e/ou tecido ósseo, ocasionando o seu estreitamento (Figuras 42 e 43). O ligamento periodontal exibia moderado número de fibroblastos e vasos sanguíneos (Figuras 44 e 45).

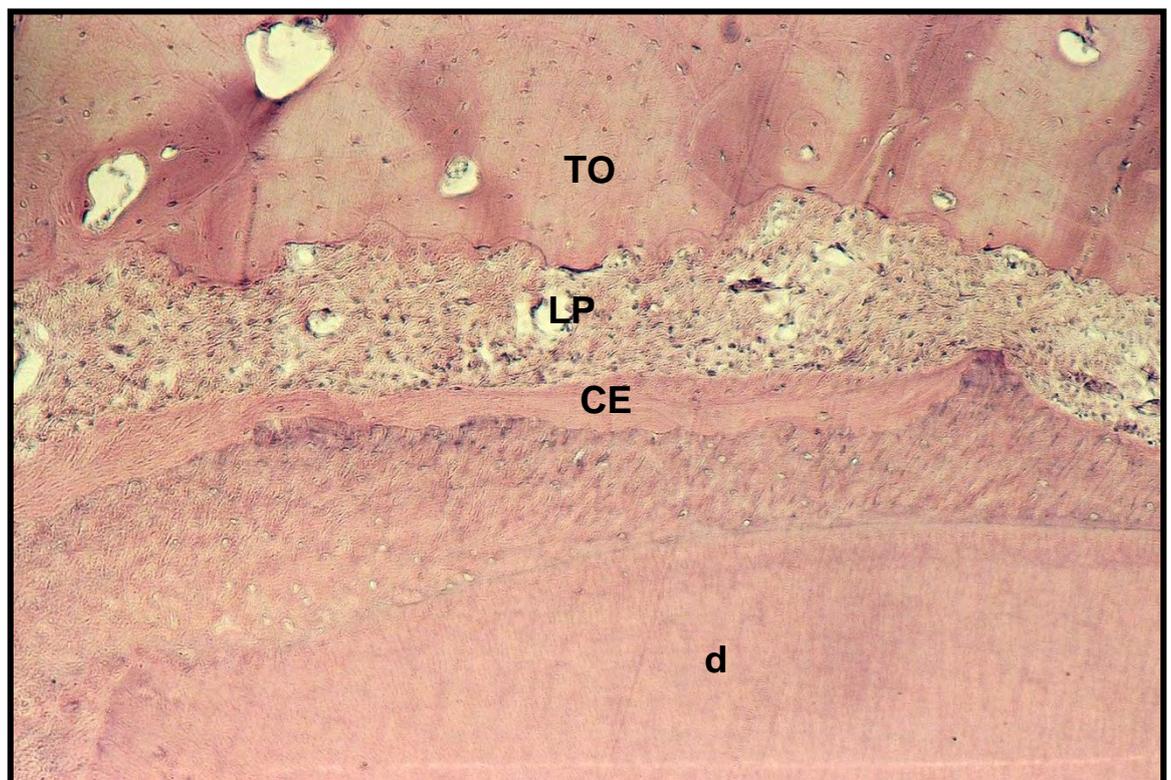


FIGURA 42- Grupo III (Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio). Estreitamento do espaço do ligamento periodontal (LP), ocasionado pelo cimento (C) e/ou tecido ósseo (TO) neoformados. H.E., original 63X. d=dentina.

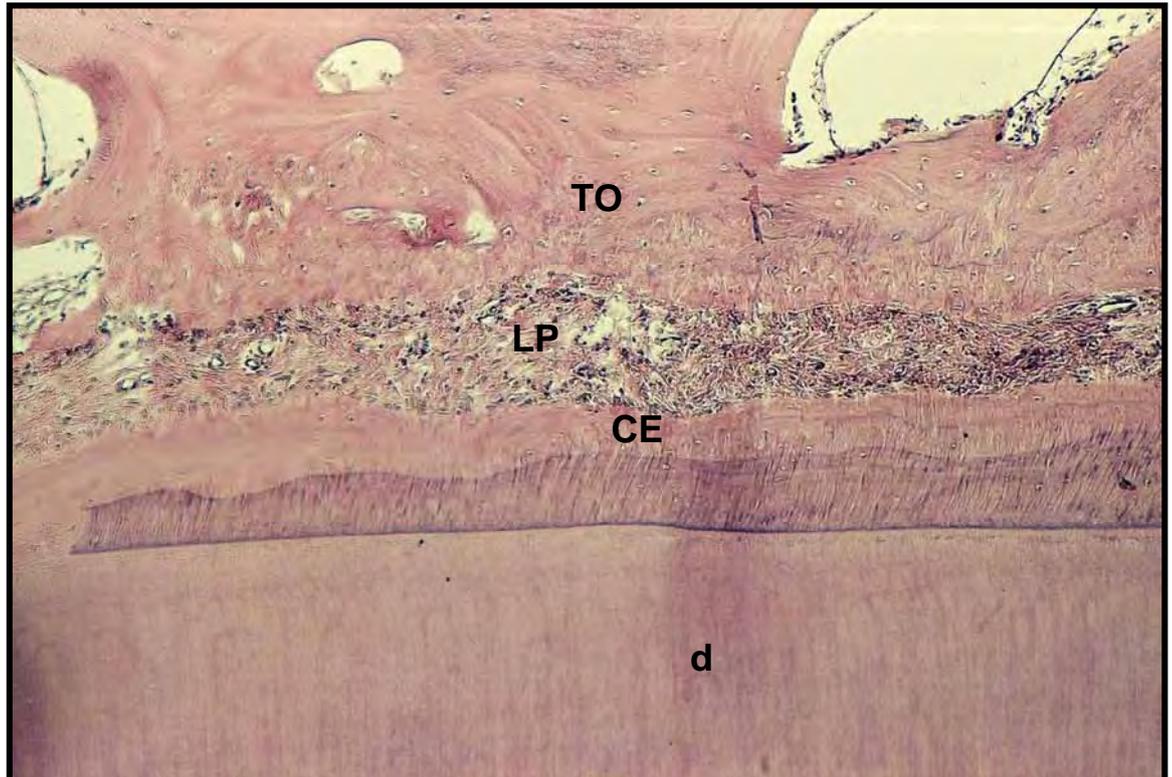


FIGURA 43- Grupo III (Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio). Estreitamento do espaço do ligamento periodontal (LP), ocasionado pelo cimento (CE) e/ou tecido ósseo (TO). H.E., original 63X. d=dentina.

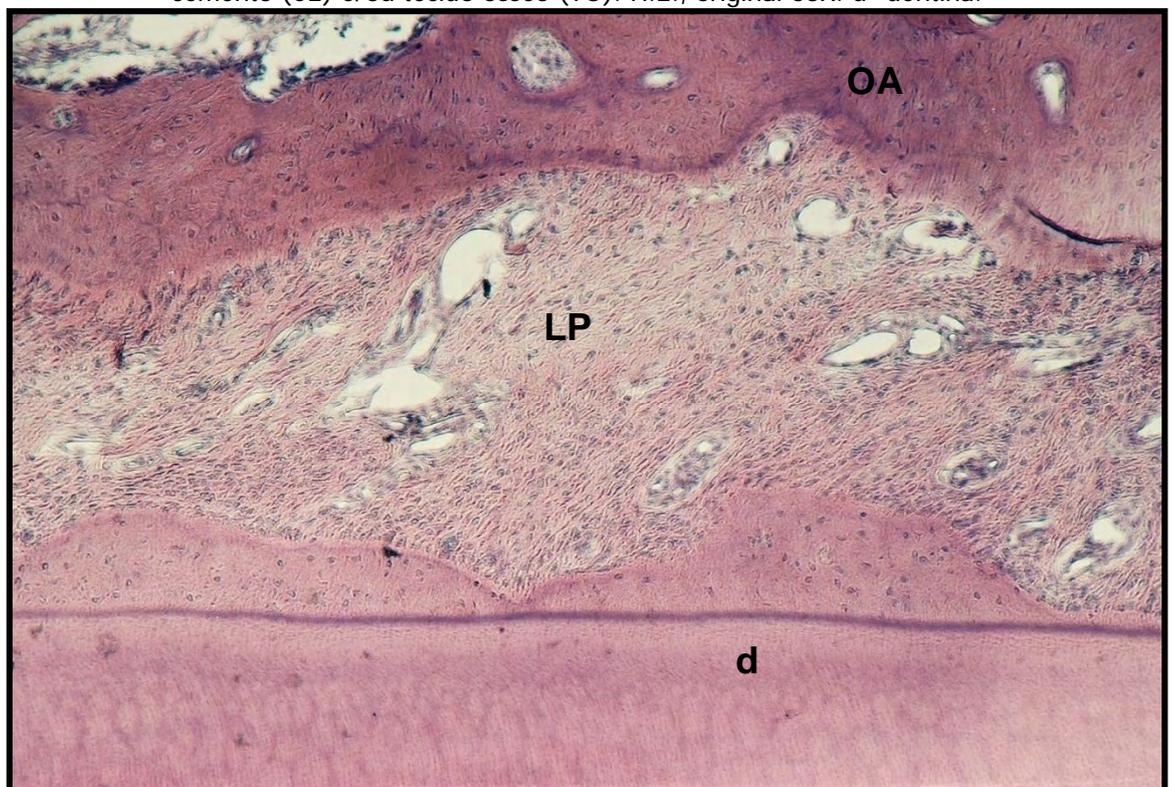


FIGURA 44- Grupo III (Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio). Ligamento periodontal (LP) exibindo moderado número de fibroblastos. H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; d=dentina.

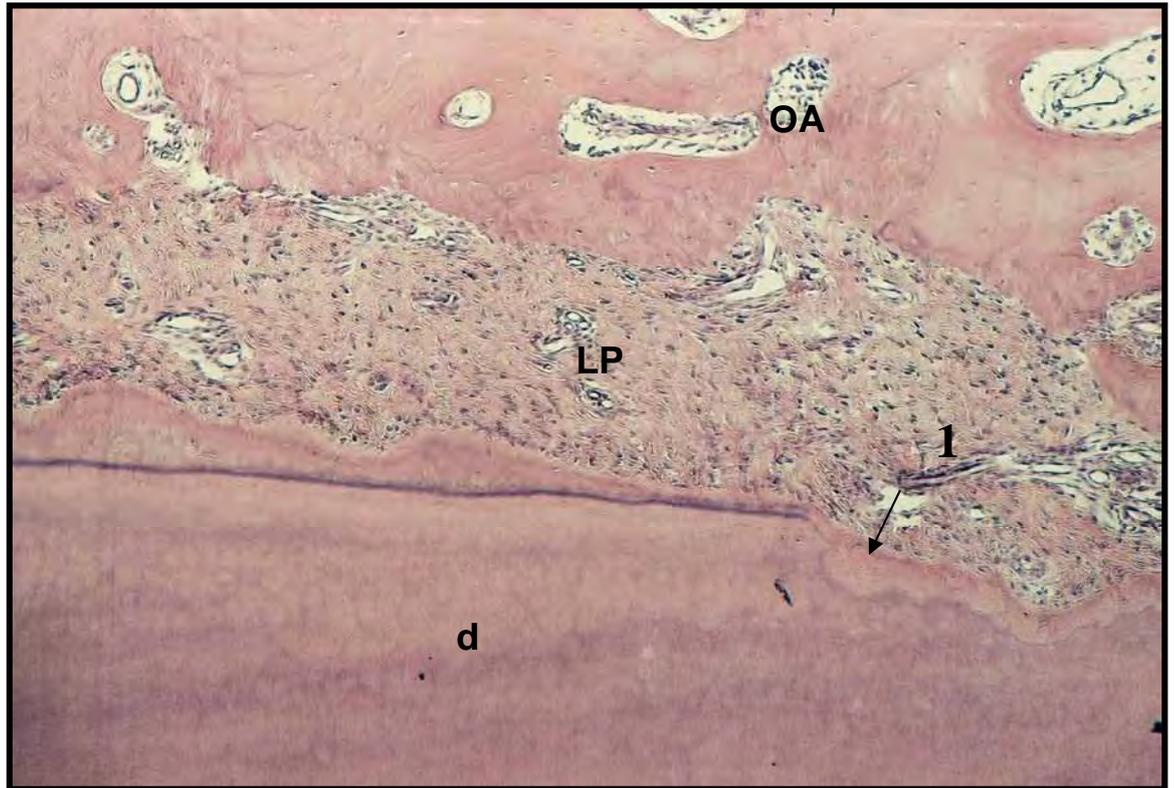


FIGURA 45- Grupo III (Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio). Ligamento periodontal (LP) com moderado número de fibroblasto. Área de reabsorção de superfície com reparo (1). H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; d=dentina.

O espaço do ligamento periodontal praticamente foi ocupado por tecido ósseo neoformado em alguns espécimes (Figura 46). Nos espécimes onde se observou o espaço do ligamento periodontal ocupado por tecido ósseo neoformado, praticamente em todos os casos notou-se a ausência de cimento (Figura 47).

Em outros, evidencia-se o espaço do ligamento periodontal praticamente preenchido por tecido conjuntivo pouco vascularizado (Figura 48).

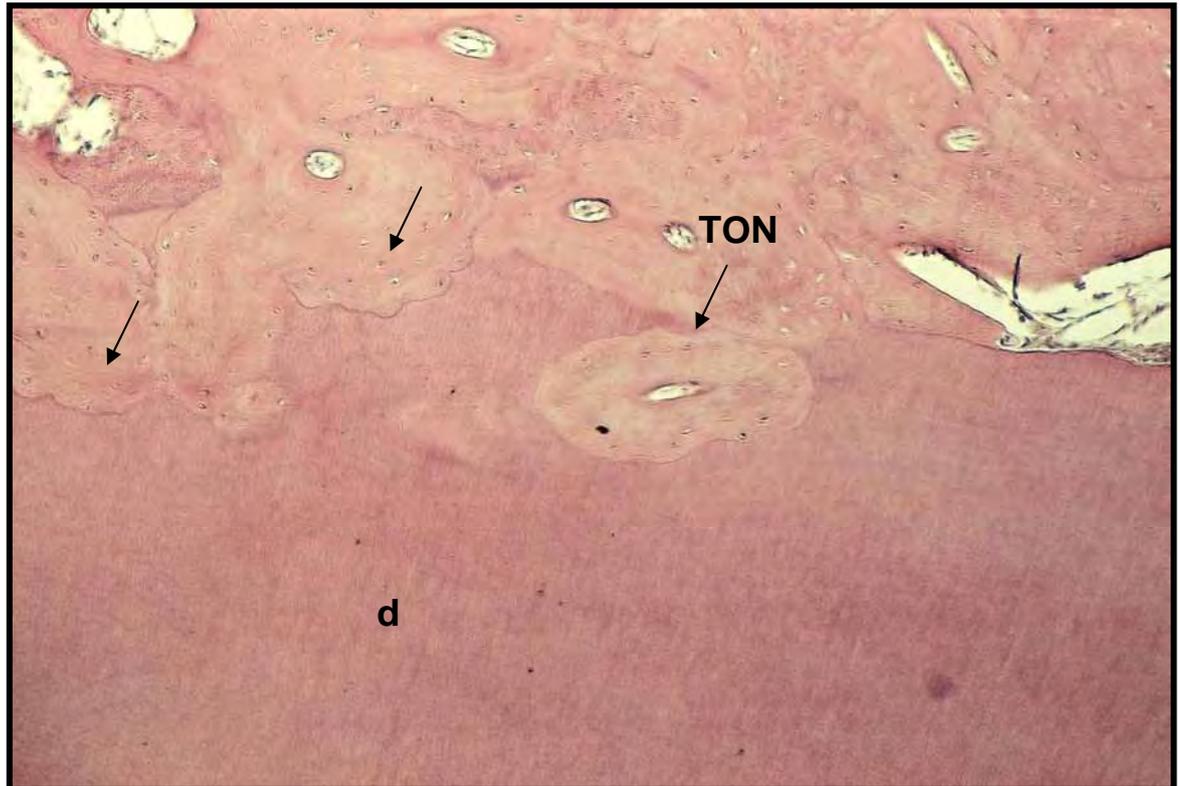


FIGURA 46- Grupo III (Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio). Espaço do ligamento periodontal preenchido com tecido ósseo neoformado (TON). H.E., original 63X. d=dentina.

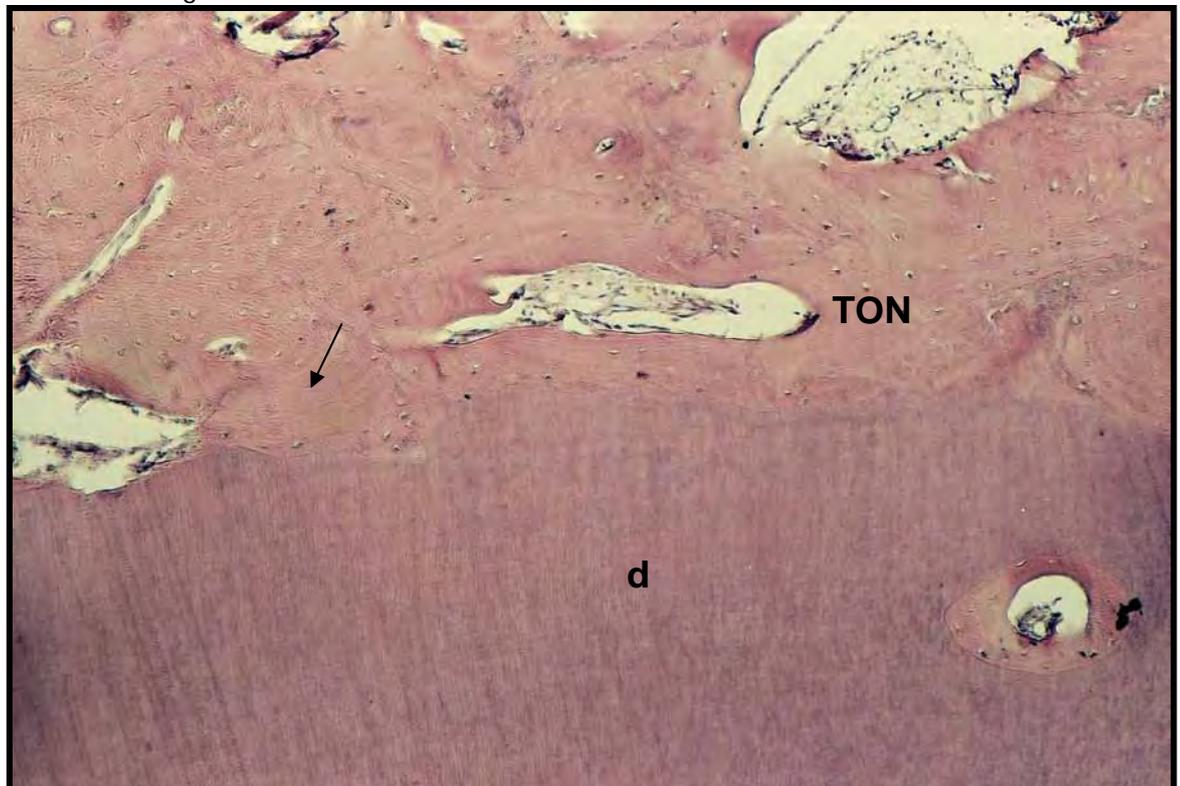


FIGURA 47- Grupo III (Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio). Espaço do ligamento periodontal preenchido com tecido ósseo neoformado (TON), com ausência de cimento. H.E., original 63X. d=dentina.

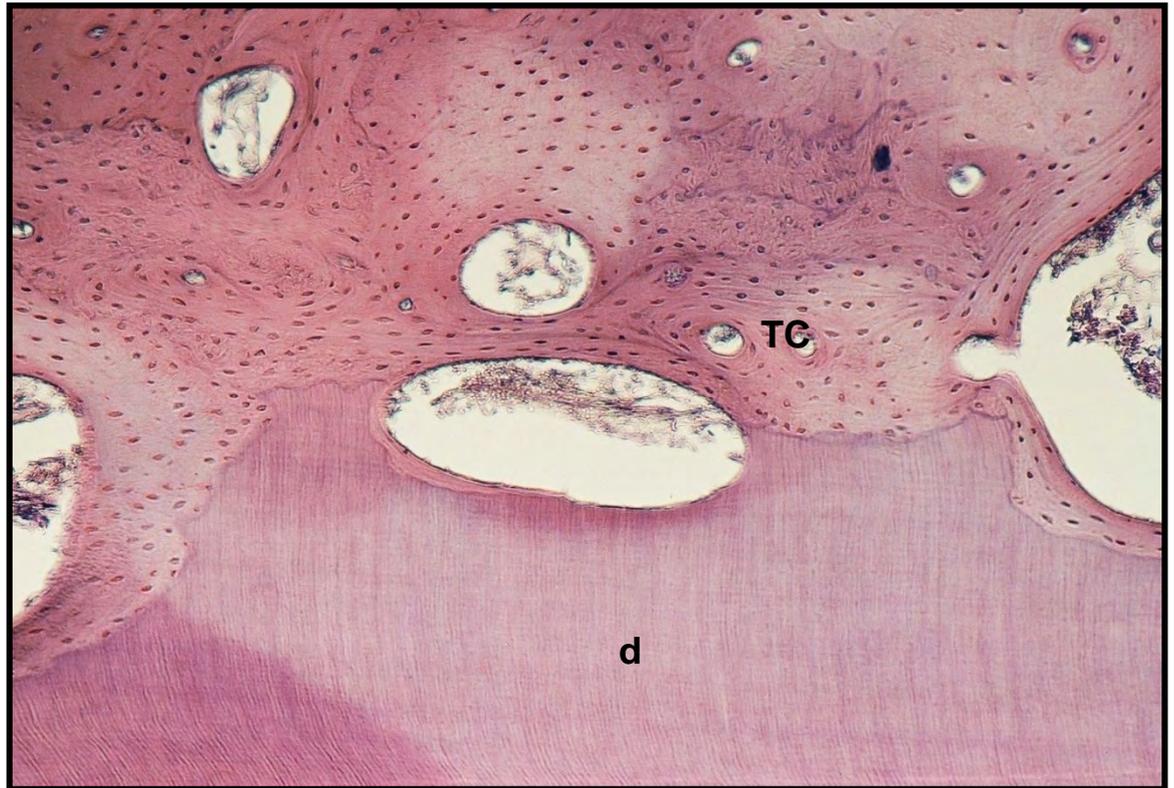


FIGURA 48- Grupo III (Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio). Espaço do ligamento periodontal preenchido com tecido conjuntivo (TC) pouco vascularizado. H.E., original 63X. d=dentina.

GRUPO IV (Reimplante com Plasma Rico em Plaquetas ativado por trombina de origem bovina e cloreto de cálcio)

Na maioria dos espécimes, a camada de cimento encontrava-se com integridade. Neste grupo, foi evidenciado áreas de reabsorções cimento-dentinárias, porém, a maioria delas, encontravam-se inativas e ocupadas por tecido conjuntivo com discreto número de fibroblastos (Figura 49).

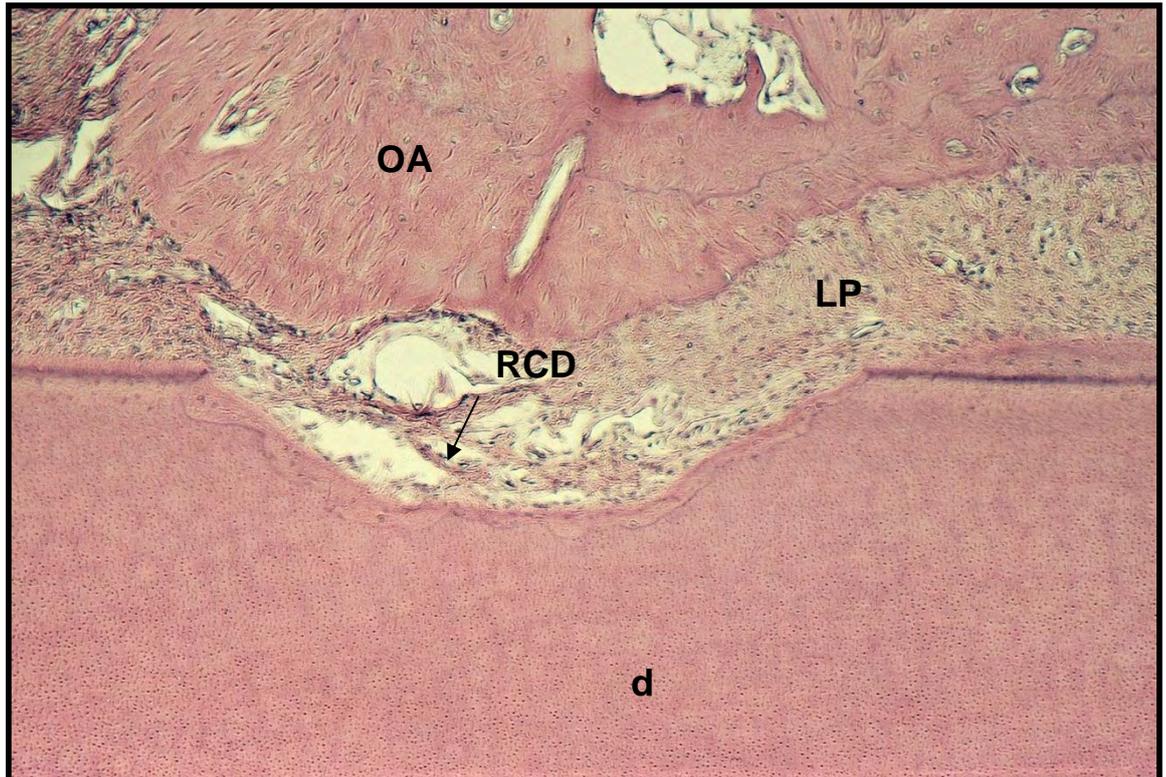


FIGURA 49- Grupo IV (Plasma Rico em Plaquetas ativado por trombina bovina e cloreto de cálcio). Discreta reabsorção cemento dentinária (RCD) ocupada por tecido conjuntivo com discretos números de fibroblastos. H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina.

Em alguns espécimes, notou-se o estreitamento do ligamento periodontal, ocasionado pelo cimento neoformado e tecido ósseo da parede alveolar (Figuras 50 e 51). A presença de cimento secundário ocasionava o estreitamento do espaço periodontal, com ligamento periodontal exibindo discreto número de fibroblastos (Figura 52).

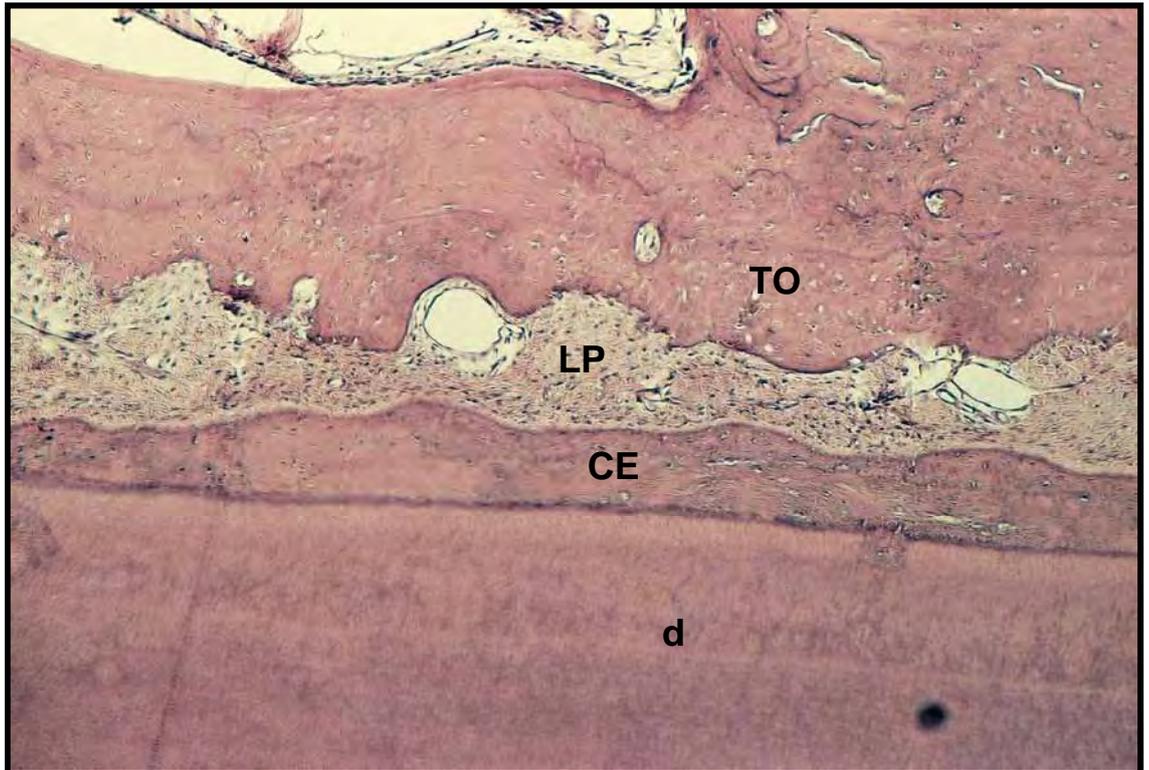


FIGURA 50- Grupo IV (Plasma Rico em Plaquetas ativado por trombina bovina e cloreto de cálcio). Estreitamento do ligamento periodontal (LP) ocasionado por cimento (CE) e tecido ósseo (TO). H.E., original 63X. d=dentina.

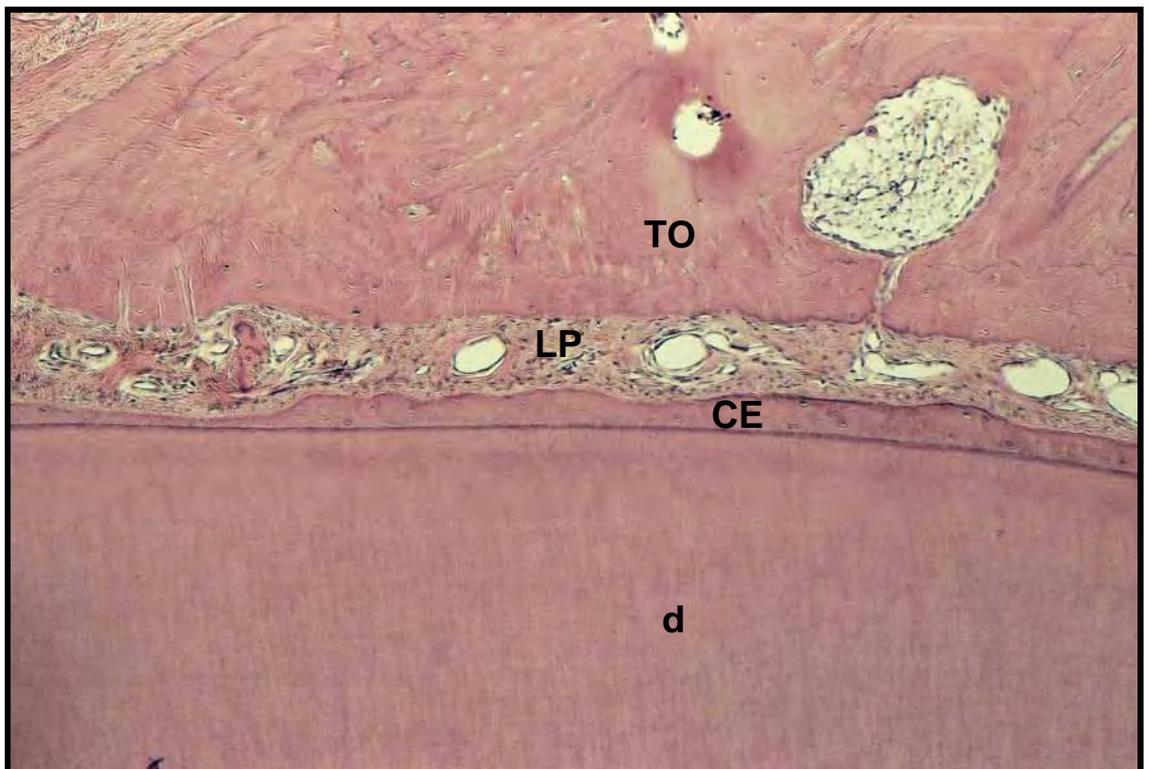


FIGURA 51- Grupo IV (Plasma Rico em Plaquetas ativado por trombina bovina e cloreto de cálcio). Estreitamento do ligamento periodontal (LP) ocasionado por cimento (CE) e tecido ósseo (TO). H.E., original 63X. d=dentina.

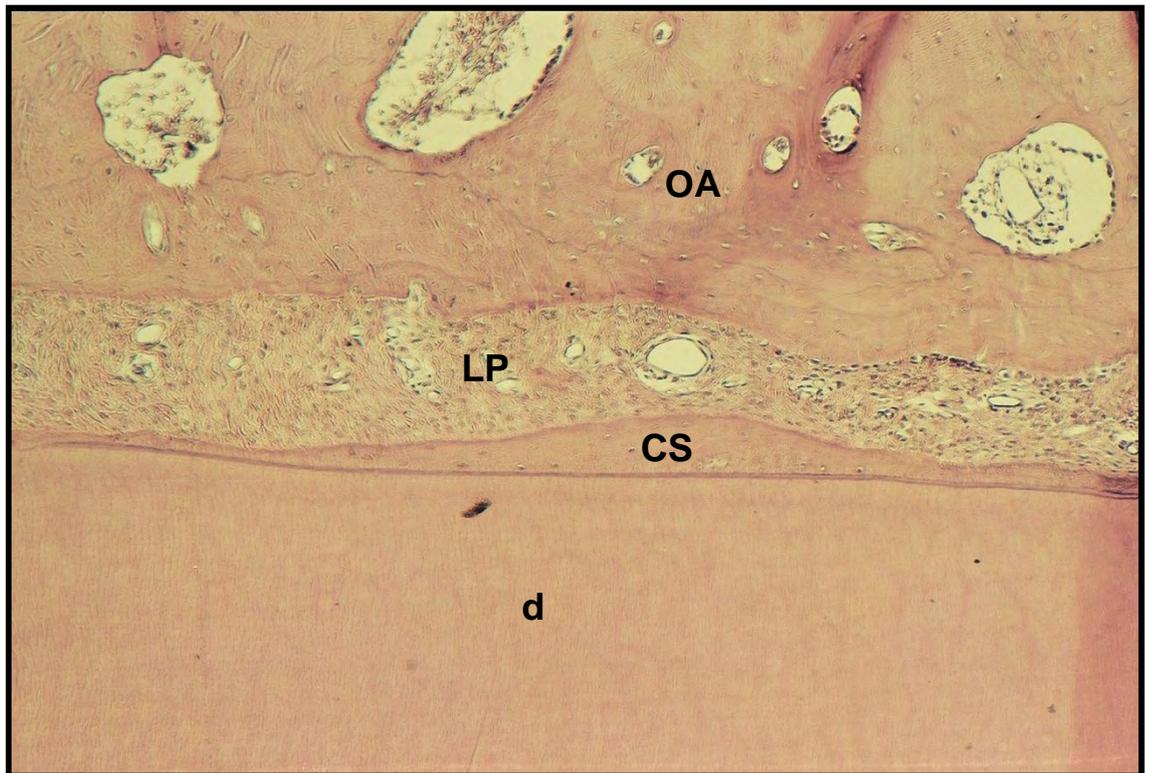


FIGURA 52- Grupo IV (Plasma Rico em Plaquetas ativado por trombina bovina e cloreto de cálcio). Estreitamento do ligamento periodontal (LP) ocasionado pela formação de cimento secundário (CS). H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; d=dentina.

Em outros casos, notou-se discreta reabsorção do cimento e dentina que se encontrava ocupada por cimento secundário. O espaço periodontal, nestes casos, achava-se reduzido, ocasionado pela neoformação óssea ao nível da parede óssea alveolar. O tecido conjuntivo exibia moderado número de fibroblastos e vasos sanguíneos (Figura 53).

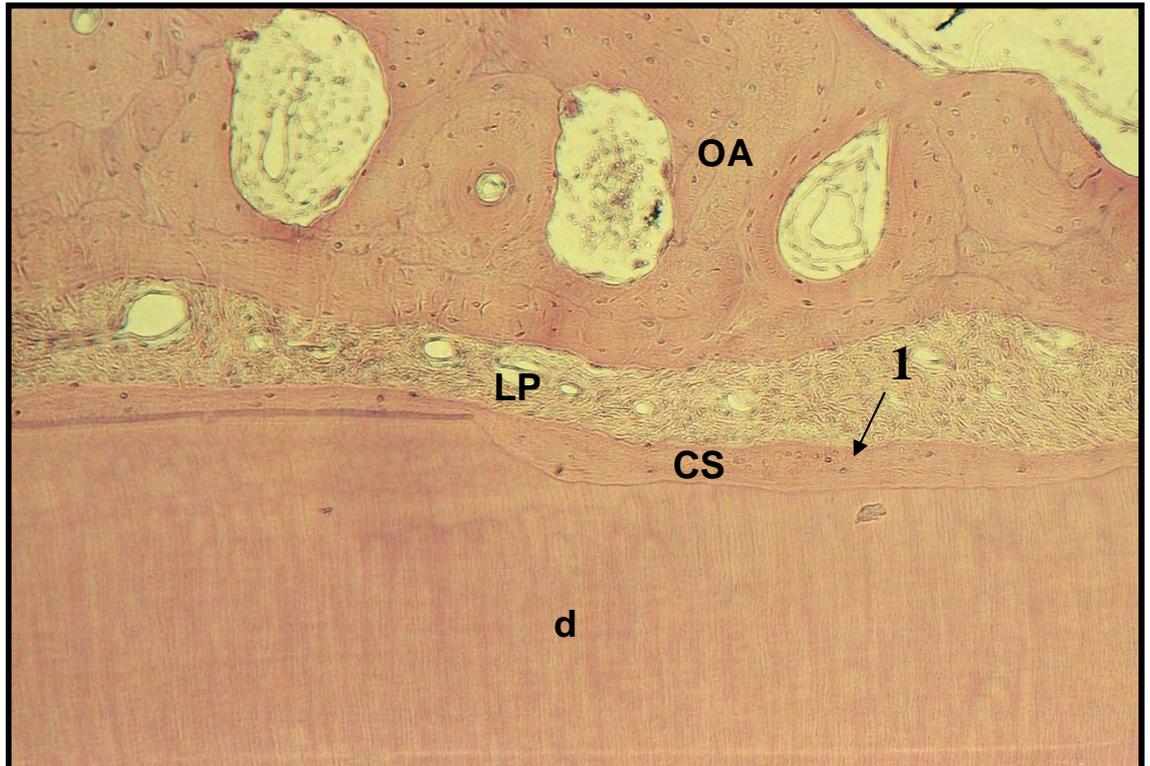


FIGURA 53- Grupo IV (Plasma Rico em Plaquetas ativado por trombina bovina e cloreto de cálcio). Discreta reabsorção de superfície (1) ocupada por cimento secundário (CS). H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina.

Em um dos casos, foi evidenciado moderada faixa de cimento secundário adjacente ao cimento original com integridade. O espaço do ligamento periodontal era amplo, exibindo um tecido conjuntivo bem vascularizado com moderado número de fibroblastos. Por outro lado, a superfície da parede óssea alveolar mostrava-se irregular (Figura 54).

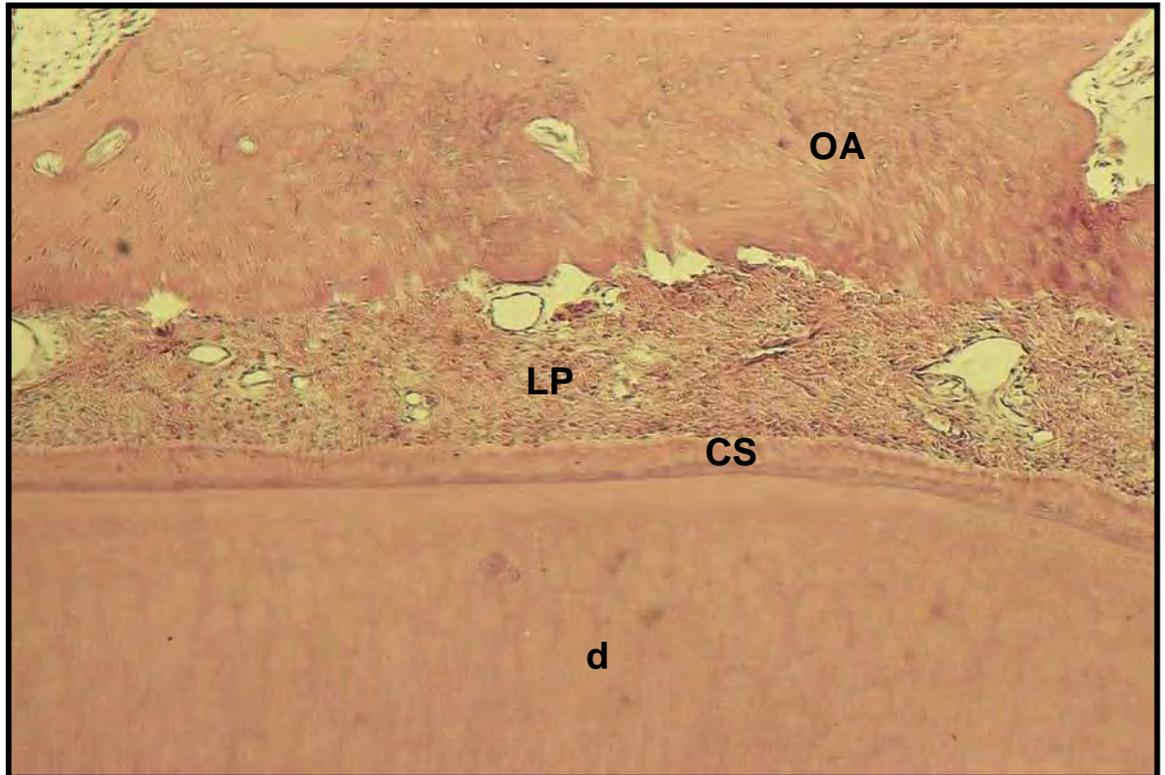


FIGURA 54- Grupo IV (Plasma Rico em Plaquetas ativado por trombina bovina e cloreto de cálcio). Moderada faixa de cimento secundário (CS) sobre o cimento original com integridade. H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina.

Na maioria dos espécimes, o ligamento periodontal exibia feixes de fibras colágenas dispostas obliquamente ao longo do eixo do espaço periodontal (Figura 55). Em alguns espécimes, o espaço periodontal encontrava-se ocupado por fibras colágenas irregulares (Figura 56).

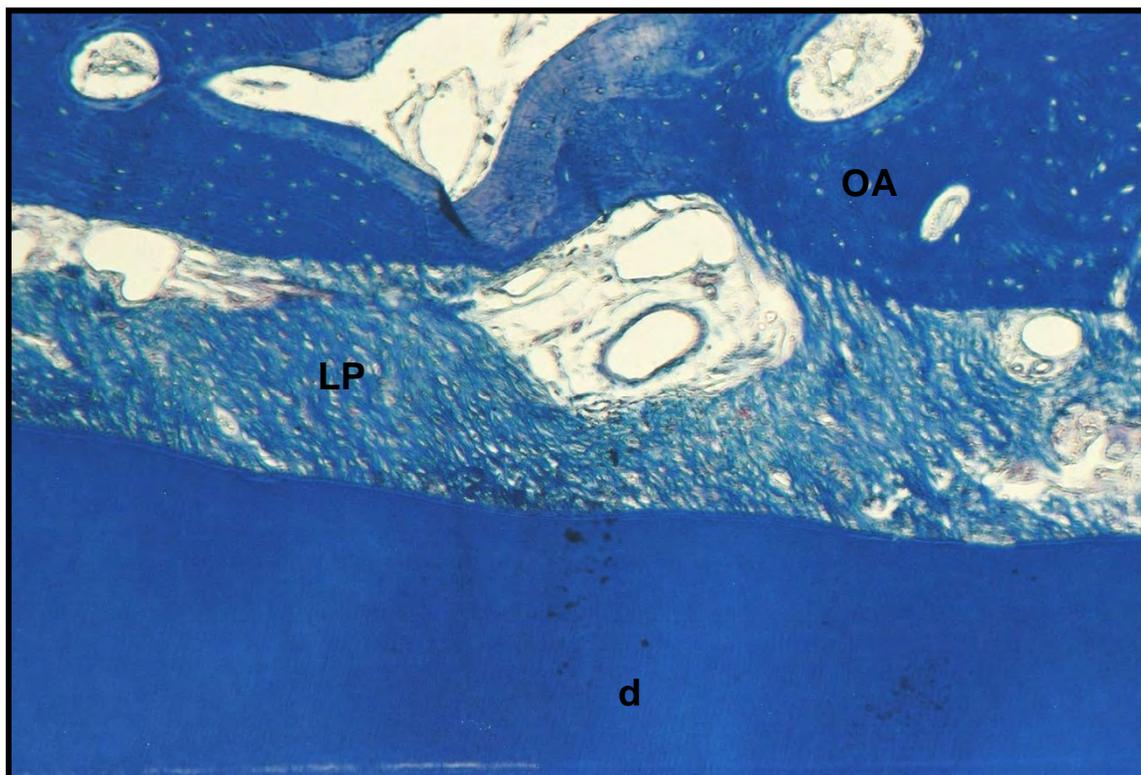


FIGURA 55- Grupo IV (Plasma Rico em Plaquetas ativado por trombina bovina e cloreto de cálcio). Espaço do ligamento periodontal (LP) mostrando feixes de fibras colágenas dispostas obliquamente. Tricrômio de Masson, original 63X. OA=Osso Alveolar; d=dentina.

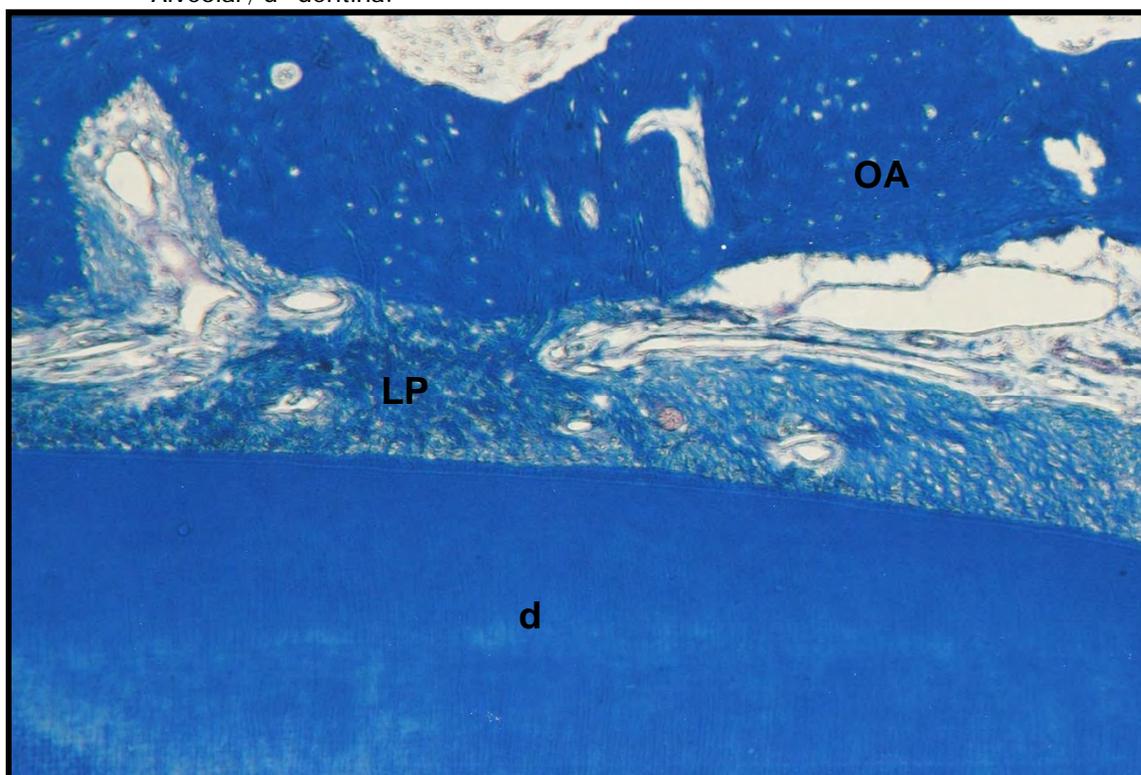


FIGURA 56- Grupo IV (Plasma Rico em Plaquetas ativado por trombina bovina e cloreto de cálcio). Espaço do ligamento periodontal (LP) mostrando feixes de fibras colágenas mais irregulares. Tricrômio de Masson, original 63X. OA=Osso Alveolar; d=dentina.

GRUPO V (Reimplante com Células-tronco associadas ao Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio)

Entre todos os grupos analisados, este grupo foi o que apresentou o maior número de espécimes com tecido ósseo neoformado em contato com área de dentina reabsorvida (Figura 57). Em alguns espécimes, notou-se áreas de reabsorção cemento-dentinária (Figura 58), ao lado de espaços do ligamento periodontal ocupado por tecido ósseo neoformado (Figura 59).

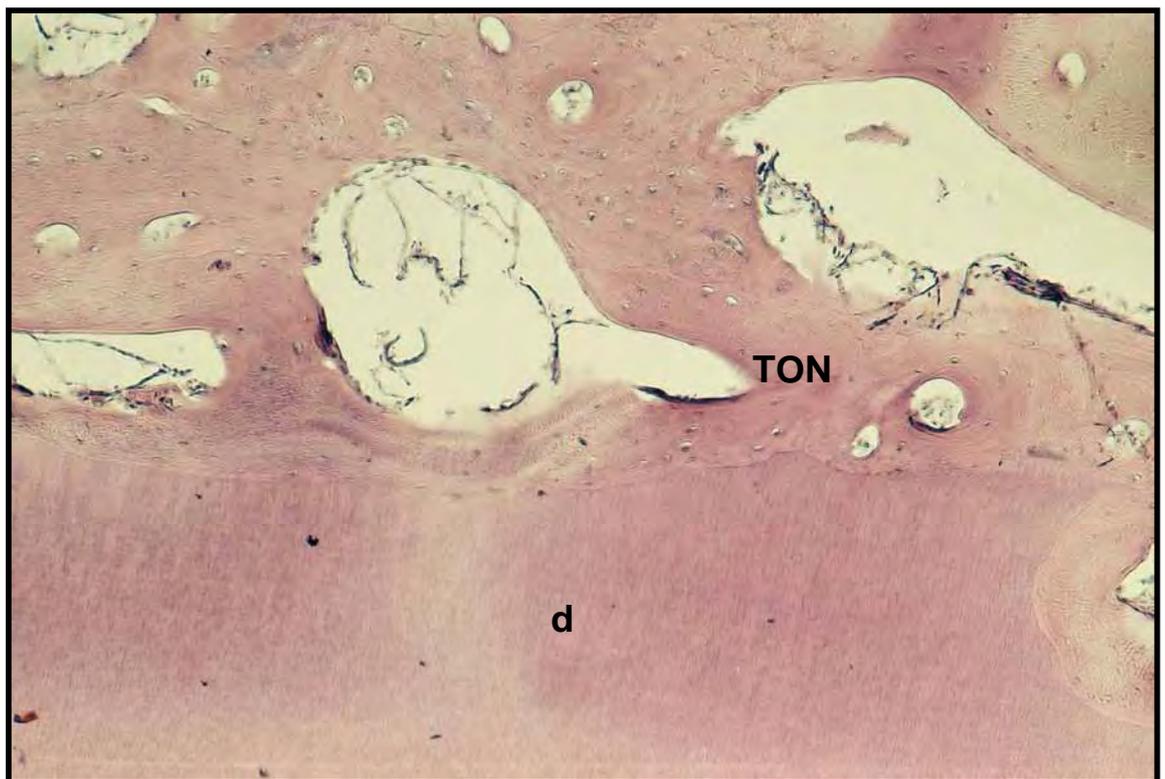


FIGURA 57- Grupo V (Células-Tronco e Plasma Rico em Plaquetas). Reabsorção por substituição: espaços do ligamento periodontal praticamente ocupado por tecido ósseo neoformado (TON). H.E., original 63X. d=dentina.

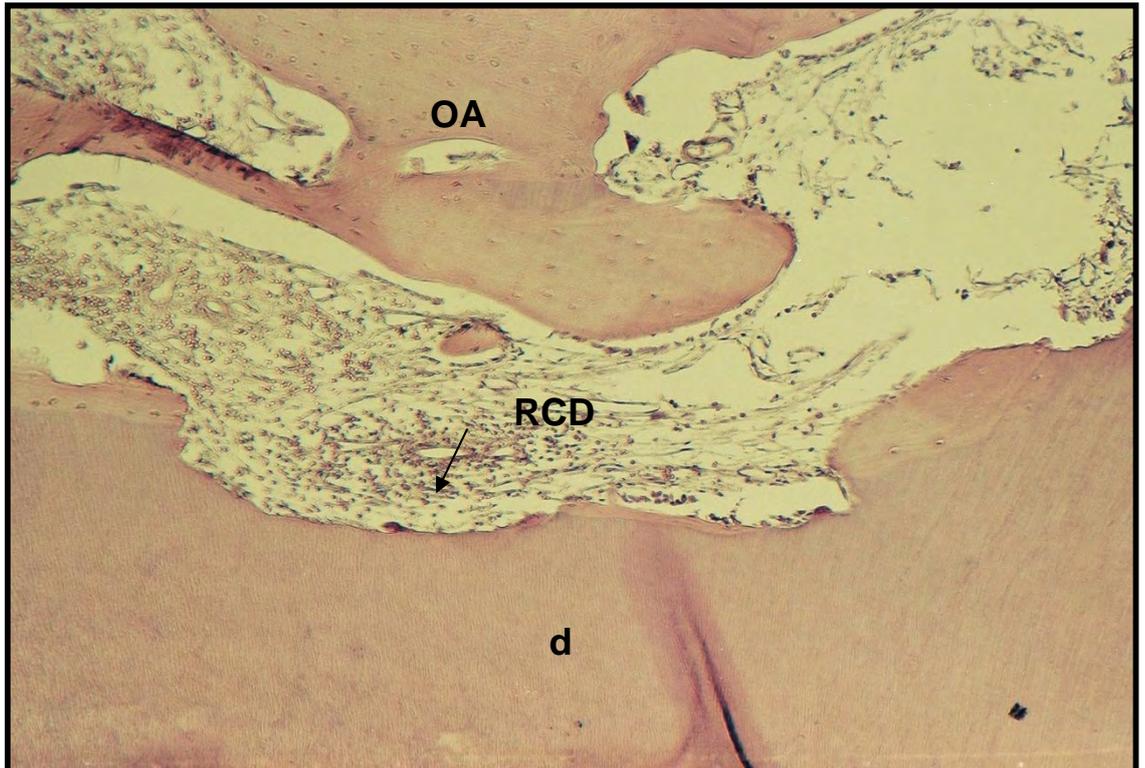


FIGURA 58- Grupo V (Células-Tronco e Plasma Rico em Plaquetas). Reabsorção inflamatória com extensas áreas de reabsorção cimento-dentinária (RCD). H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; d=dentina.

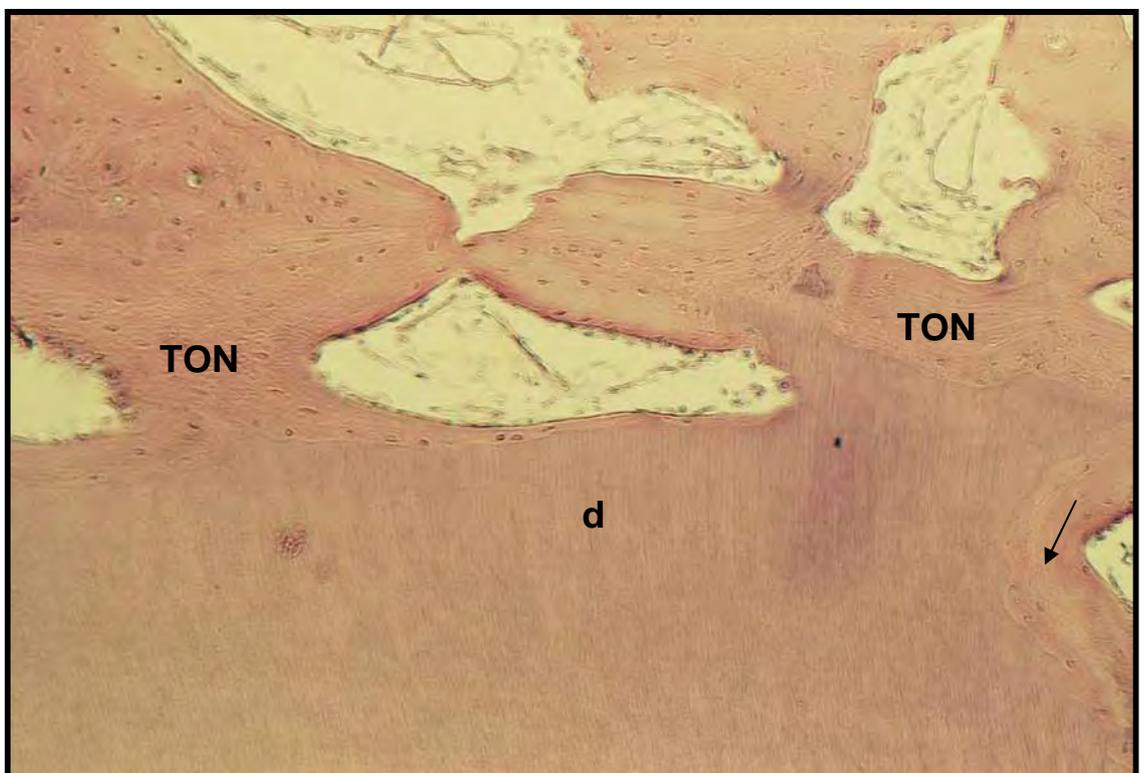


FIGURA 59- Grupo V (Células-Tronco e Plasma Rico em Plaquetas). Espaço do ligamento periodontal ocupado por tecido ósseo neoformado (TON). H.E., original 63X. d=dentina.

Em outro espécime, evidenciou-se a superfície cementária parcialmente ocupada por tecido ósseo com estreita faixa de tecido conjuntivo junto à parede óssea. Observa-se ainda, áreas com reabsorção ativa da parede óssea. Evidencia-se também, áreas de cimento e dentina reabsorvidas (Foto 60).

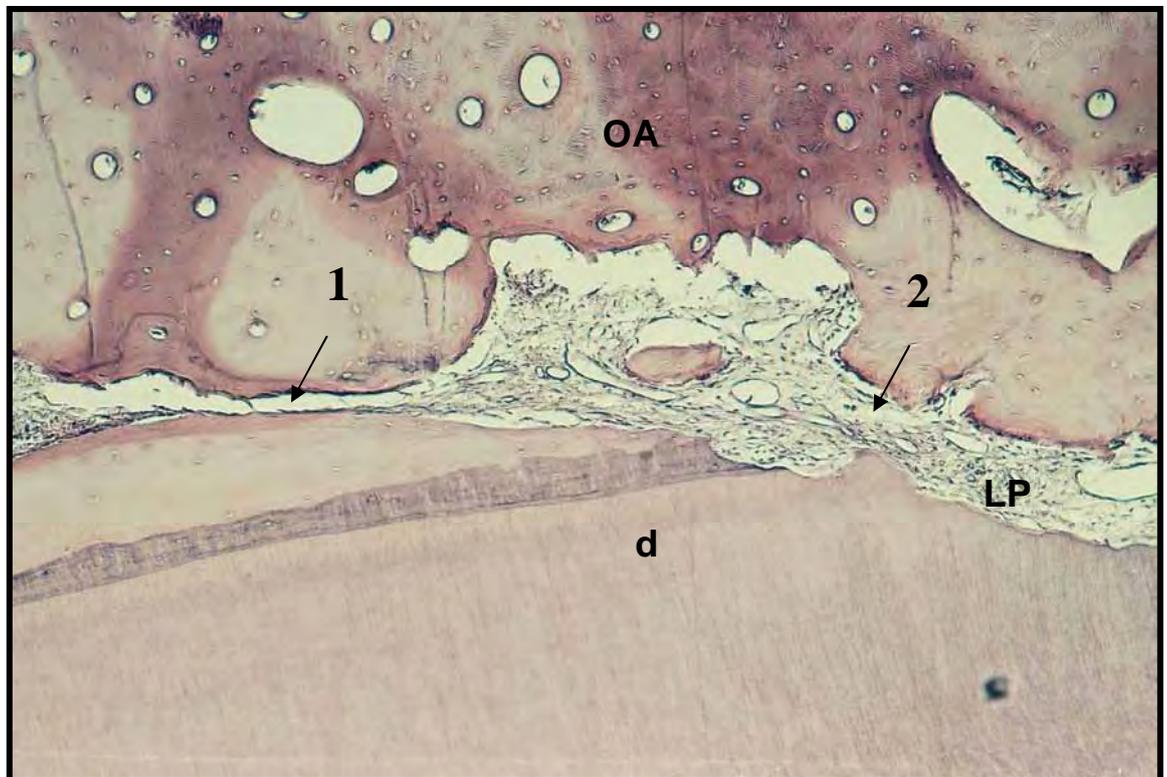


FIGURA 60- Grupo V (Células-Tronco e Plasma Rico em Plaqueta). Superfície cementária parcialmente ocupada por tecido ósseo (1). Áreas de cimento e dentina reabsorvidas (2). H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina.

Em quatro espécimes, notou-se o espaço do ligamento periodontal irregular e encontrava-se ocupado por tecido conjuntivo com discreto número de fibroblastos (Figura 61). Em um deles, áreas de reabsorções cemento-dentinária encontravam-se inativas. O espaço do ligamento periodontal nessas áreas era irregular, notando-se tecido conjuntivo com moderado número de fibroblastos (Figura 62). Nos demais, evidenciou-se a presença de cimento secundário sobre a superfície cementária preexistente. Nestes casos, o ligamento periodontal mostrou discreto número de fibroblastos (Figura 63).

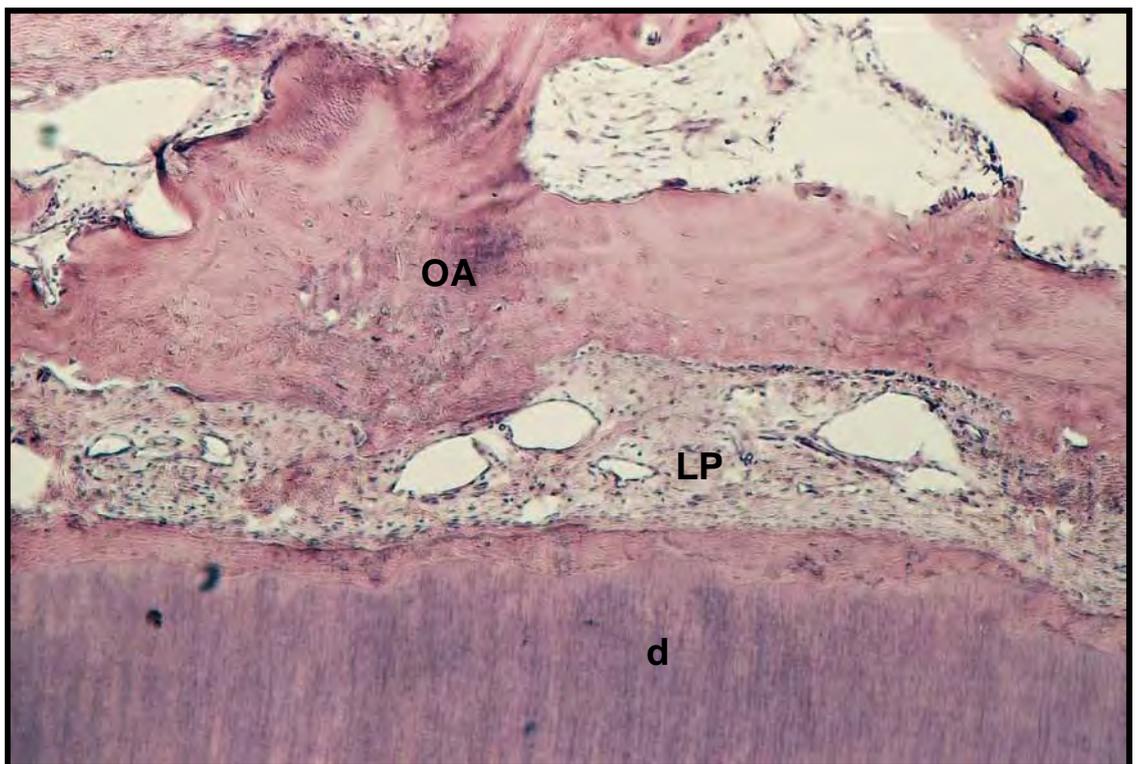


FIGURA 61- Grupo V (Células-Tronco e Plasma Rico em Plaquetas). Espaço do ligamento periodontal (LP) irregular ocupado por tecido conjuntivo com discreto número de fibroblastos. H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; d=dentina.

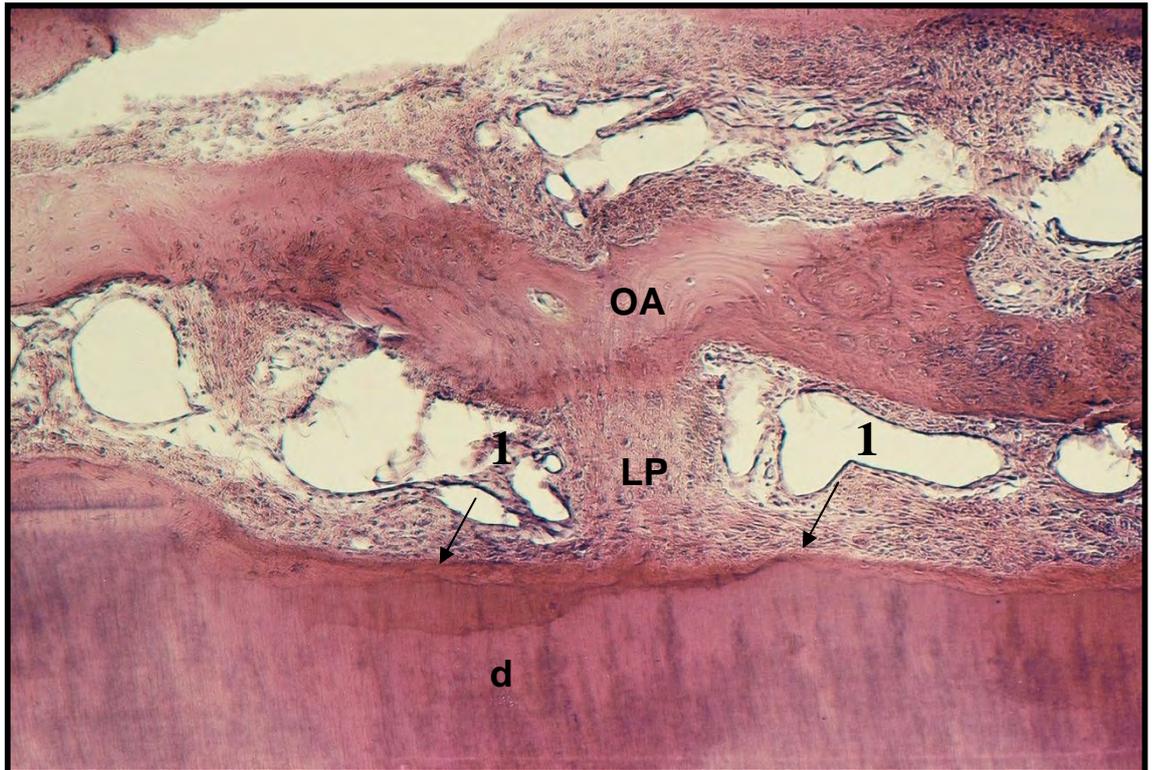


FIGURA 62- Grupo V (Células-Tronco e Plasma Rico em Plaquetas). Áreas inativas de reabsorção de superfície (1). H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina.

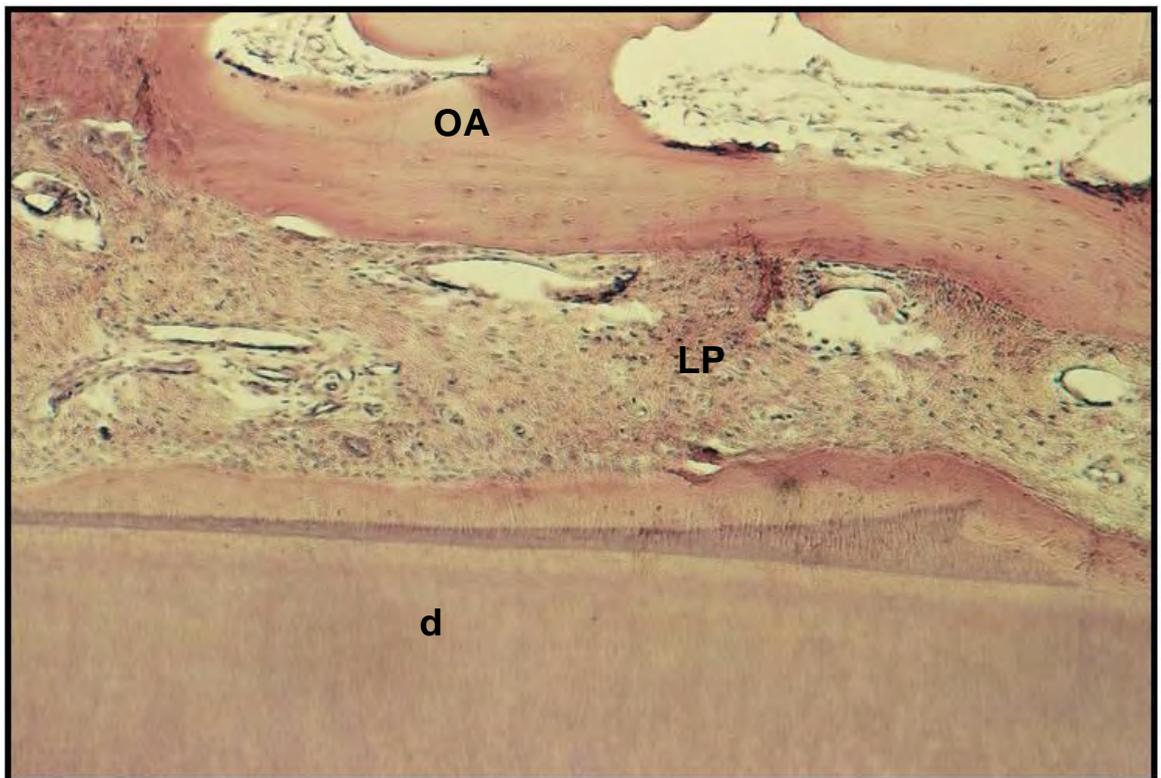


FIGURA 63- Grupo V (Células-Tronco e Plasma Rico em Plaquetas). Presença de cimento secundário (CS) sobre a superfície do cimento pré-existente. H.E., original 63X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina.

5.2 ANÁLISE DE IMUNO HISTOQUÍMICA

A análise das imunomarcações foi realizada na região da interface entre dente, ligamento periodontal e osso alveolar, nos 2/3 médios da raiz. As análises dessas marcações seguiram o mesmo agrupamento descrito para a avaliação histológica.

GRUPO I (Controle)

Nos dentes em que foi realizado o controle negativo, foram observadas imunomarcações para osteopontina nas células da linhagem osteoblástica presentes no ligamento periodontal (Figura 64). Nas áreas de osso alveolar, foi possível observar a osteopontina principalmente em osteócitos localizados em suas lacunas.

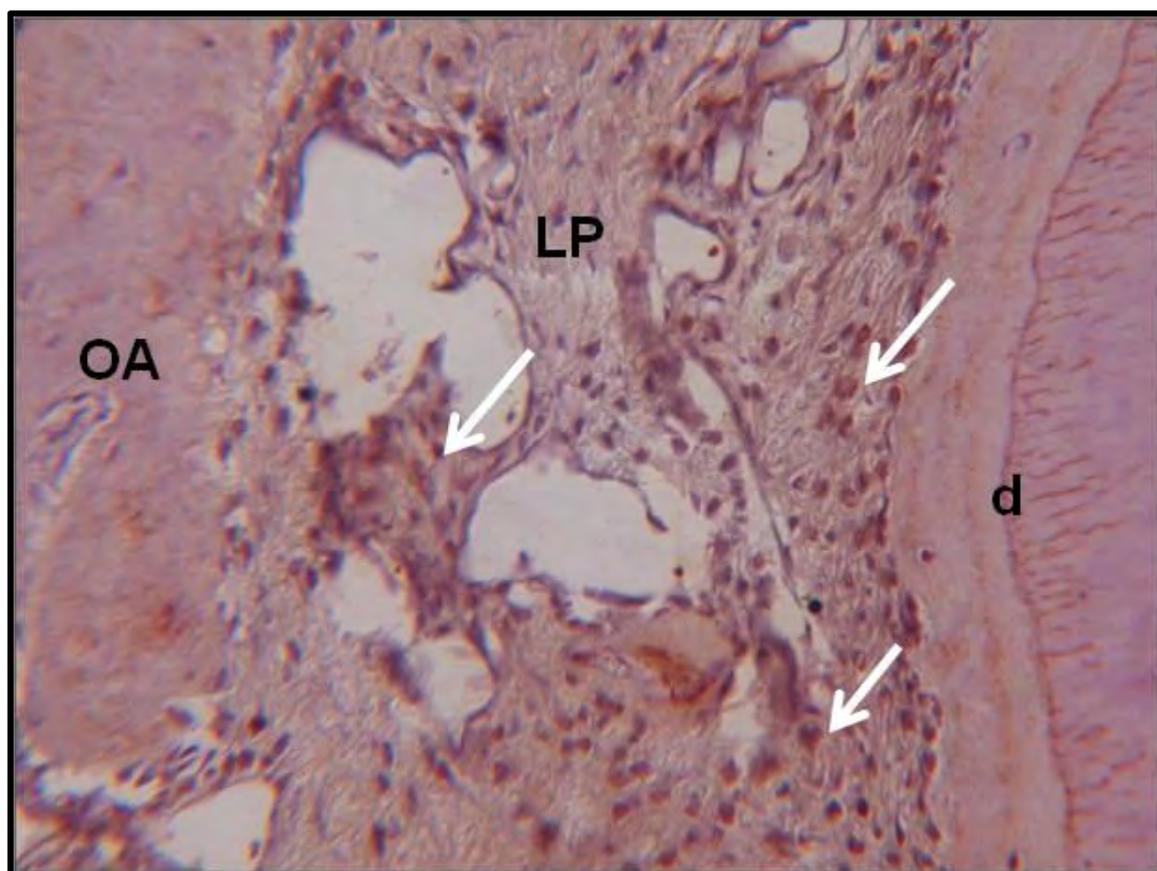


Figura 64- Grupo I (Controle). Imunomarcações positivas para células osteoblásticas no Ligamento Periodontal (setas). Aumento de 40X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina.

Neste grupo, foram observadas células da linhagem osteoclástica através de imunomarcações positivas para TRAP em poucos espécimes, sendo observadas principalmente em regiões do osso alveolar (Figura 65).

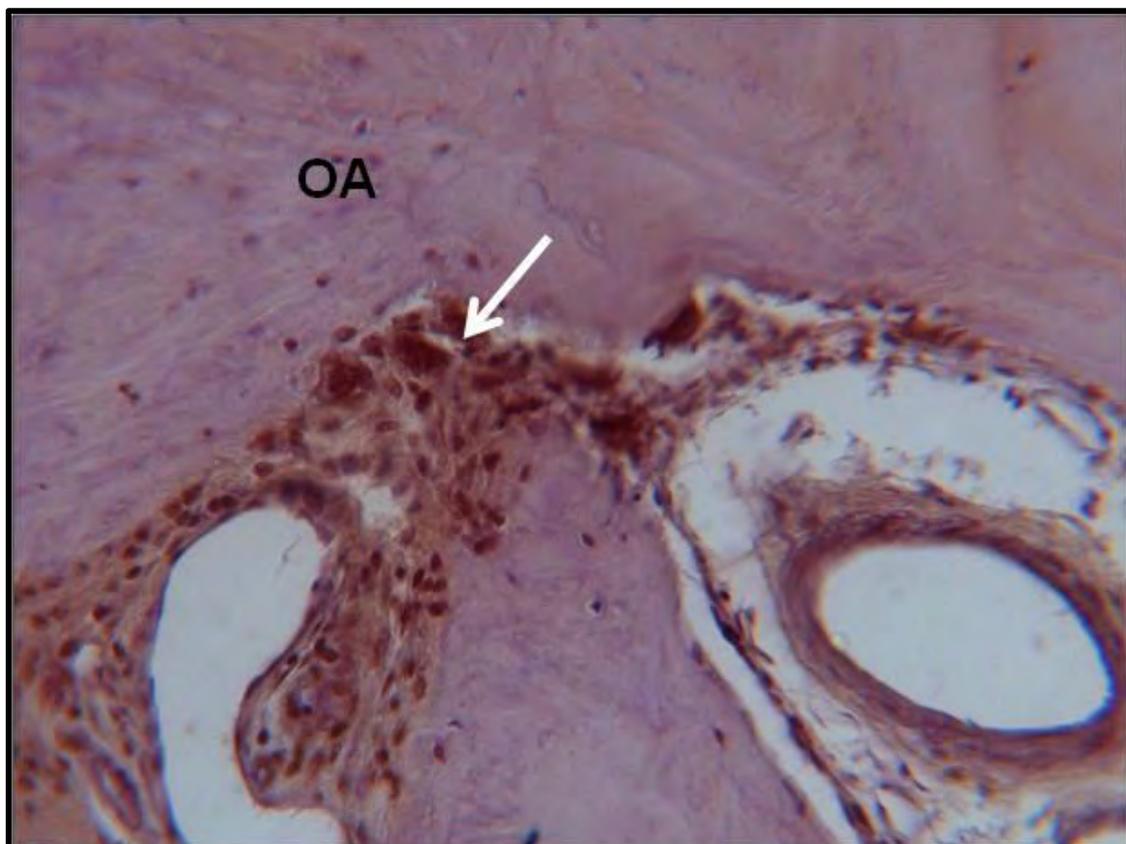


Figura 65- Grupo I (Controle). Imunomarcações positivas para células osteoclásticas na região de osso alveolar (seta). Aumento de 40X. OA=Osso Alveolar.

GRUPO II (Plasma Pobre em Plaquetas)

Neste grupo, foi observada a reabsorção da dentina e a presença de imunomarcações positivas para osteopontina em células da linhagem clástica (Figura 66). Em alguns espécimes, as regiões onde há remanescente do ligamento periodontal, foi observada uma imunomarkação mais discreta da osteopontina nas células da linhagem osteoclástica. Vale destacar que no osso alveolar, esta proteína

da matriz apresentou-se bem marcada principalmente nos osteócitos, presentes nas suas lacunas.

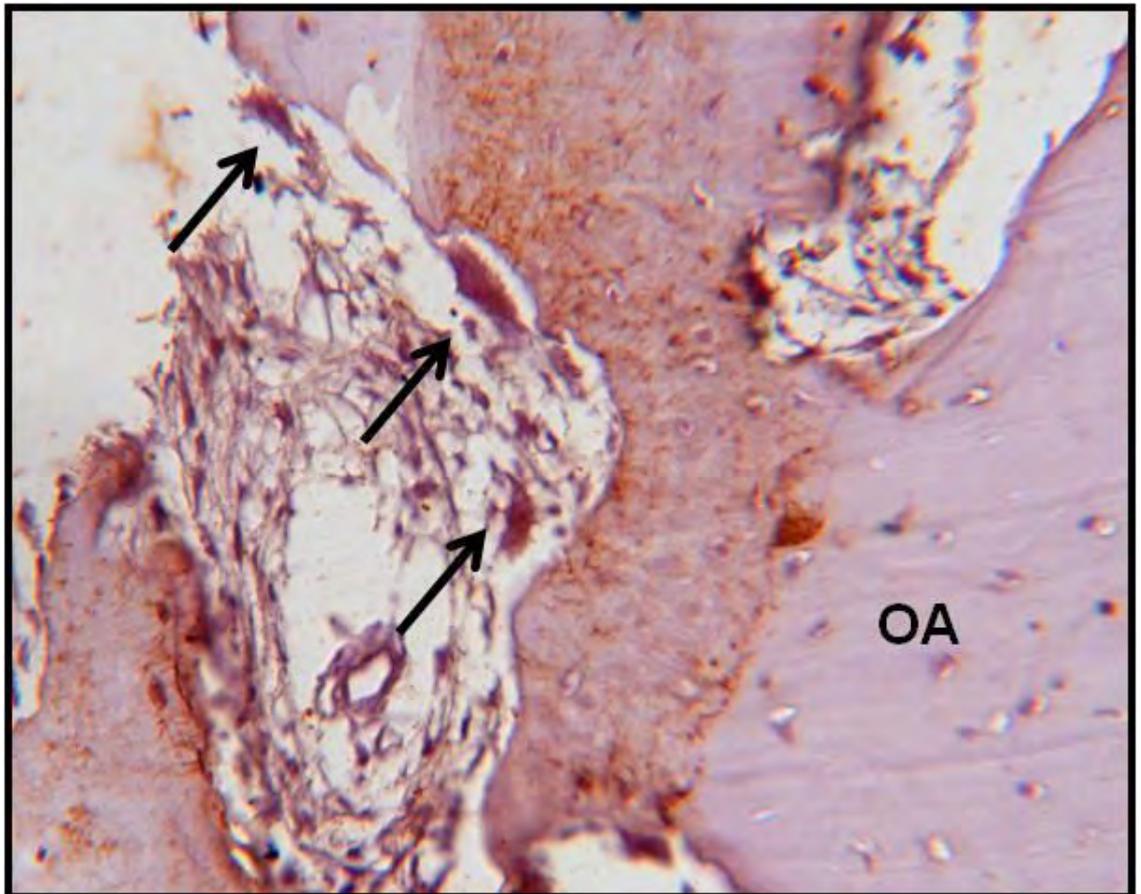


FIGURA 66- Grupo II (Plasma Pobre em Plaquetas). Ligamento periodontal com imunomarcações para a linhagem clástica (setas). Aumento de 40X. OA=Osso Alveolar.

Em relação à imunomarcações para TRAP, essas foram observadas em alguns espécimes, sendo que, em dois deles, as mesmas foram bem evidentes para células da linhagem clástica, principalmente nas regiões de superfície dentária e osso alveolar (Figura 67).

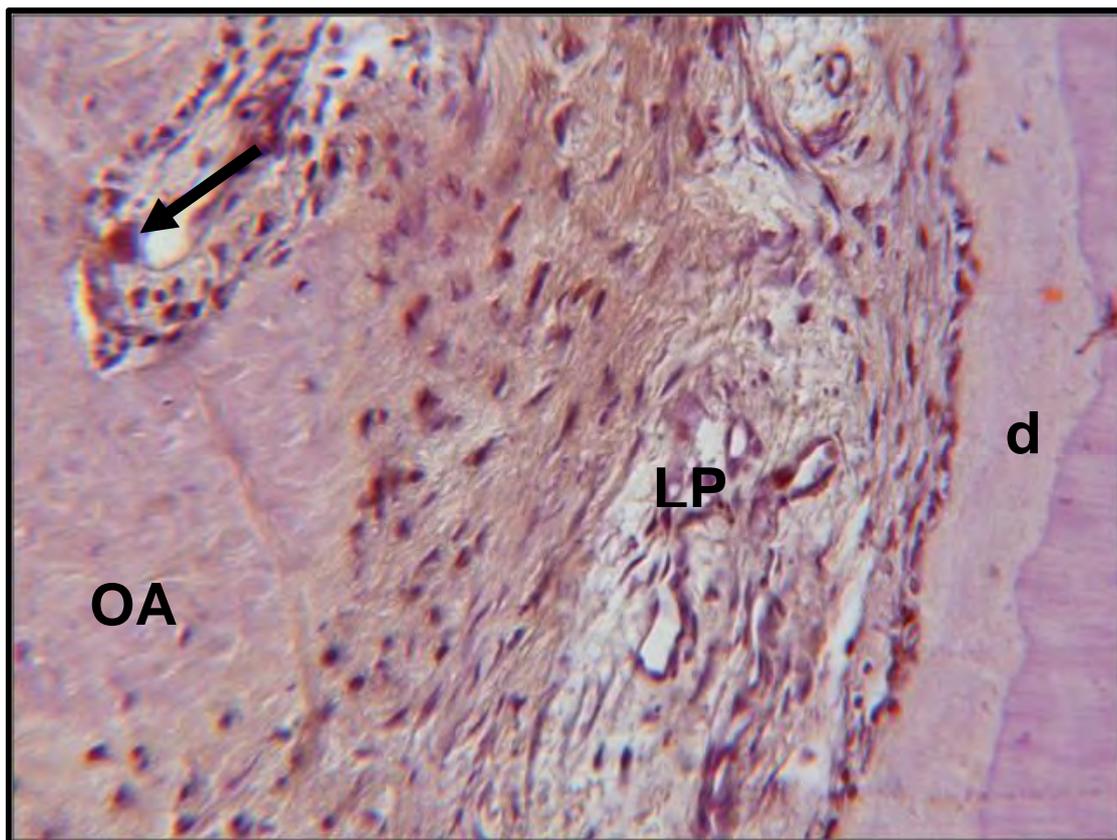


FIGURA 67- Grupo II (Plasma Pobre em Plaquetas). Imunomarcações positivas para a linhagem clástica na região de osso alveolar (seta). Aumento de 40X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina.

GRUPO III (Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio)

Foi observada, neste grupo, a presença das respostas de reabsorção e de anquilose. Em ambas as situações, foram observadas imunomarcações intensas para osteopontina (Figura 68). Nas áreas de anquilose, foram observadas imunomarcações intensas para osteopontina principalmente em osteócitos presentes nas lacunas do osso alveolar. Foi possível visualizar também pontos de mineralização óssea, com imunomarcação positiva para osteopontina, mostrando o papel desta proteína da matriz no processo de mineralização do tecido ósseo. Nas regiões onde foram

observados remanescentes do ligamento periodontal, também foram observadas imunomarcações positivas para osteopontina em células da linhagem osteoblástica.

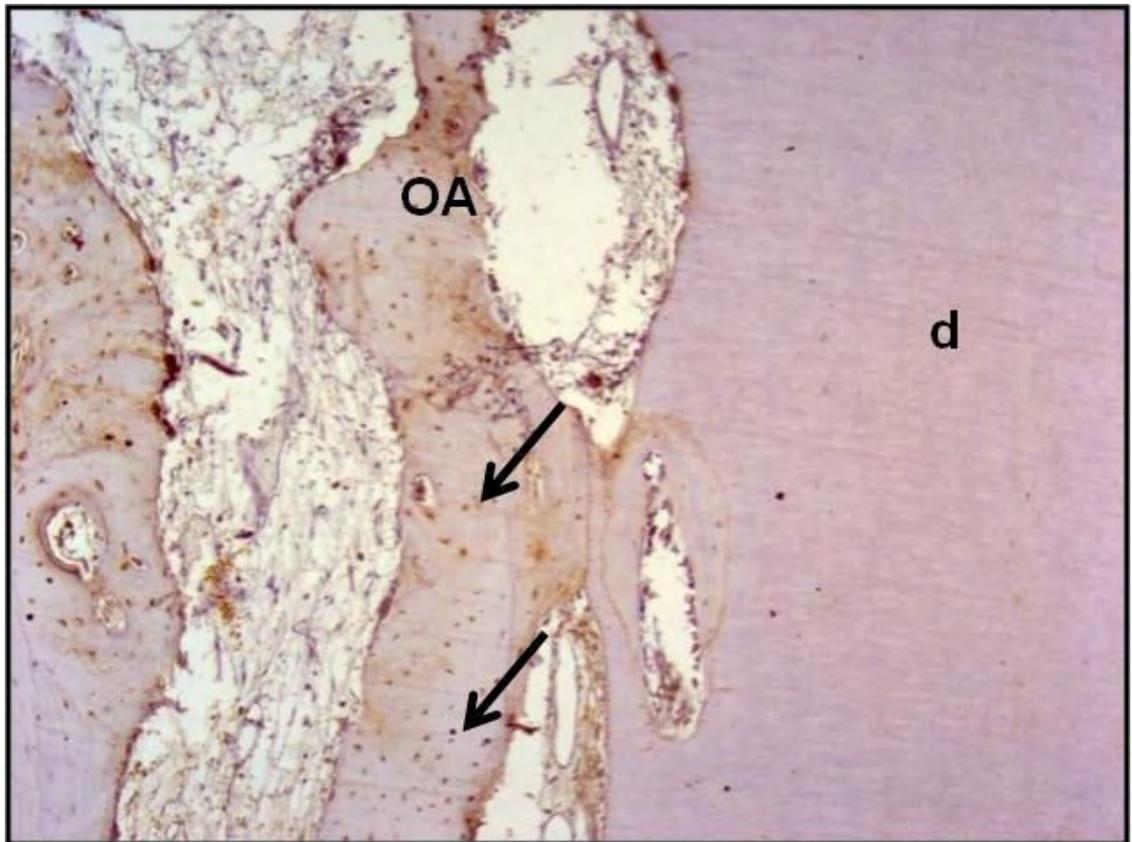


FIGURA 68- Grupo III (Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio). Área de anquilose com imunomarcação intensa para a osteopontina na linhagem osteoblástica (setas). Aumento de 10X. OA=Osso Alveolar; d=dentina.

As imunomarcações para TRAP foram menos evidentes, sendo observado células da linhagem clástica em algumas regiões da superfície dentária e no osso alveolar (Figura 69).

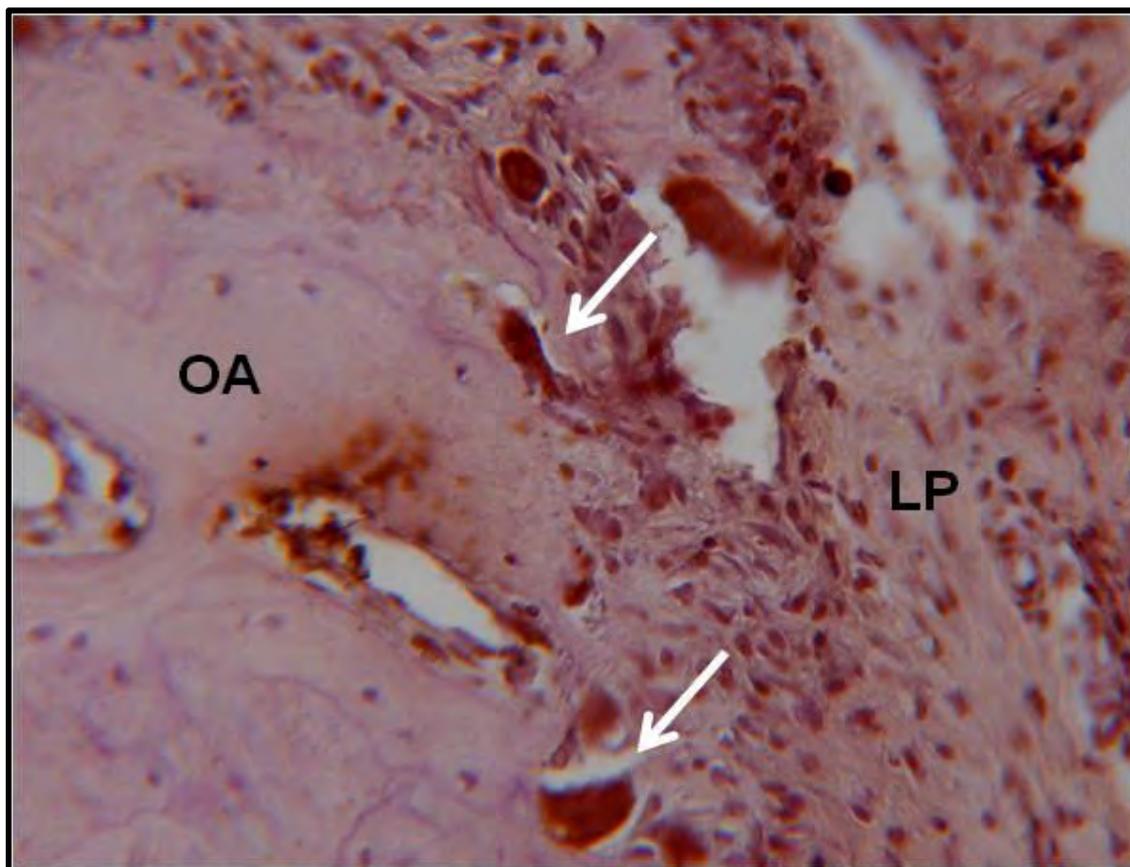


FIGURA 69- Grupo III (Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio). Espécime com imunomarcações positivas para linhagem clástica no osso alveolar (setas). Aumento de 40X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal.

GRUPO IV (Reimplante com Plasma Rico em Plaquetas ativado por trombina de origem bovina e cloreto de cálcio)

Já neste grupo foi evidenciada imunomarcações bastante intensas para osteopontina, mostrando também a participação desta proteína no processo de mineralização do tecido ósseo. Vale destacar que em alguns espécimes foi possível observar a região do cimento com marcação positiva para a osteopontina. Nestes espécimes, o ligamento periodontal apresentou marcações intensas de células da linhagem osteoblástica, com a presença de marcações intensas também no osso alveolar e osteócitos presentes nas suas lacunas (Figura 70).

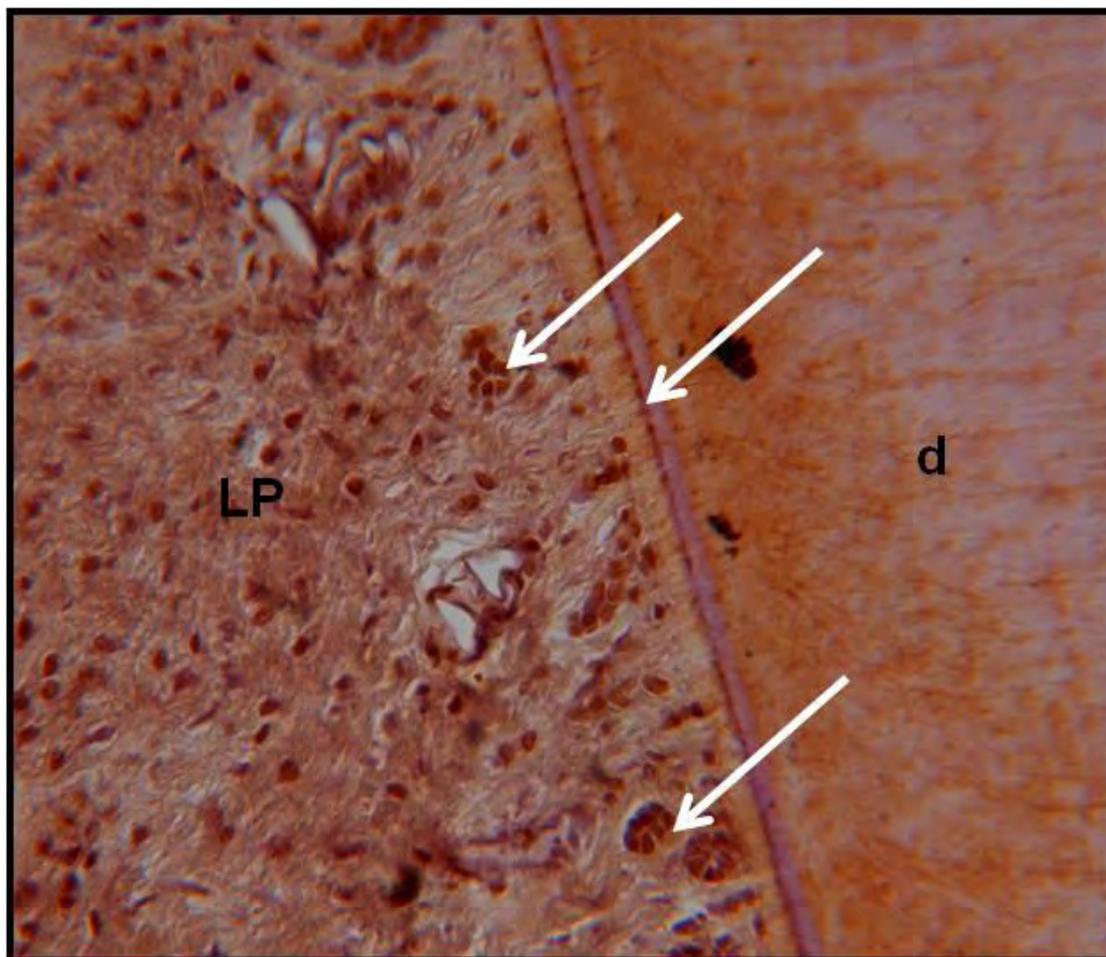


FIGURA 70- Grupo IV (Plasma Rico em Plaquetas ativado por trombina bovina e cloreto de cálcio). Área de cimento e ligamento periodontal com intensa marcação para a osteopontina (setas). Aumento de 40X. LP=Ligamento Periodontal; d=dentina.

Já as imunomarcações para a TRAP foram muito raras neste grupo, sendo observada apenas em dois espécimes através de discretas marcações especialmente na região próxima ao osso alveolar (Figura 71).

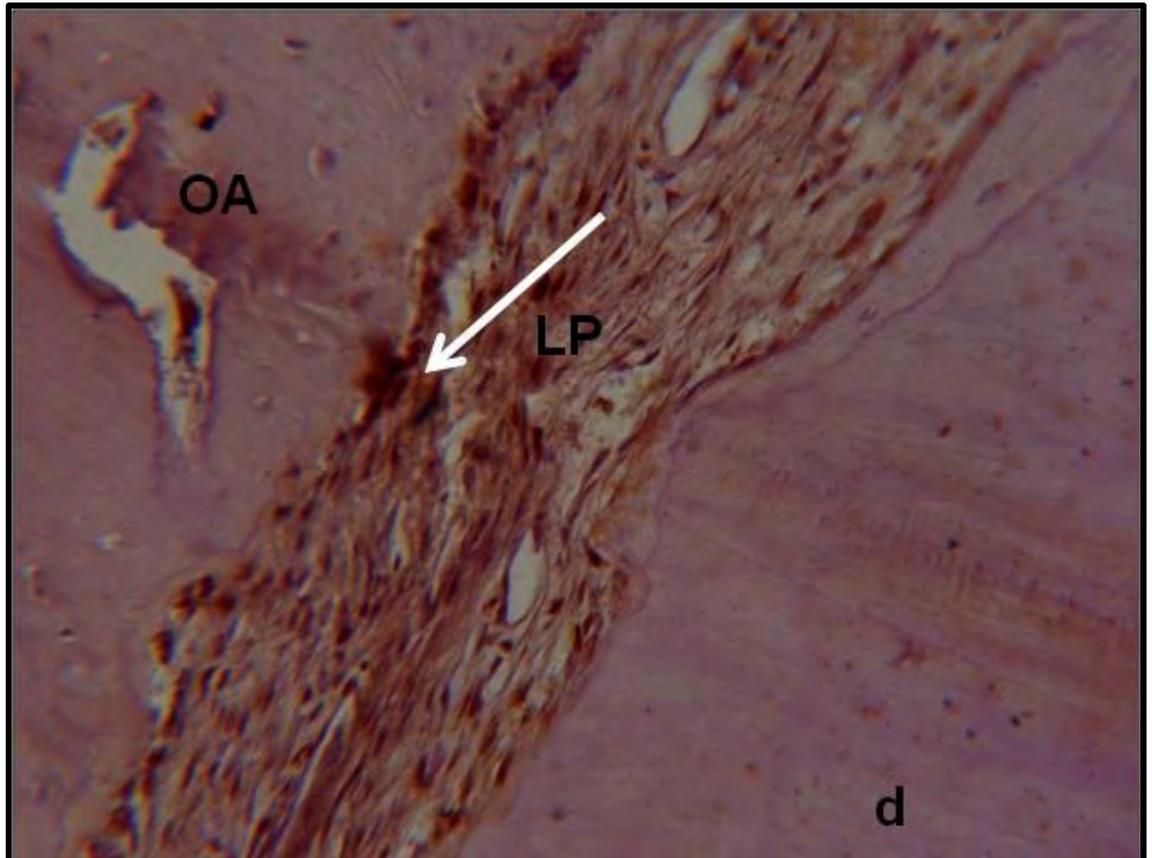


FIGURA 71- Grupo IV (Plasma Rico em Plaquetas ativado por trombina bovina e cloreto de cálcio). Imunomarcações discretas para a linhagem de células clásticas (seta). Aumento de 40X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina.

GRUPO V (Reimplante com células-tronco associadas ao Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio)

Neste grupo foram observadas respostas de reabsorção por substituição e nestas áreas, foram observadas imunomarcações positivas para osteopontina (Figura 72). Nas regiões onde havia remanescente do ligamento periodontal, foram observadas imunomarcações positivas para as células da linhagem osteoblástica.

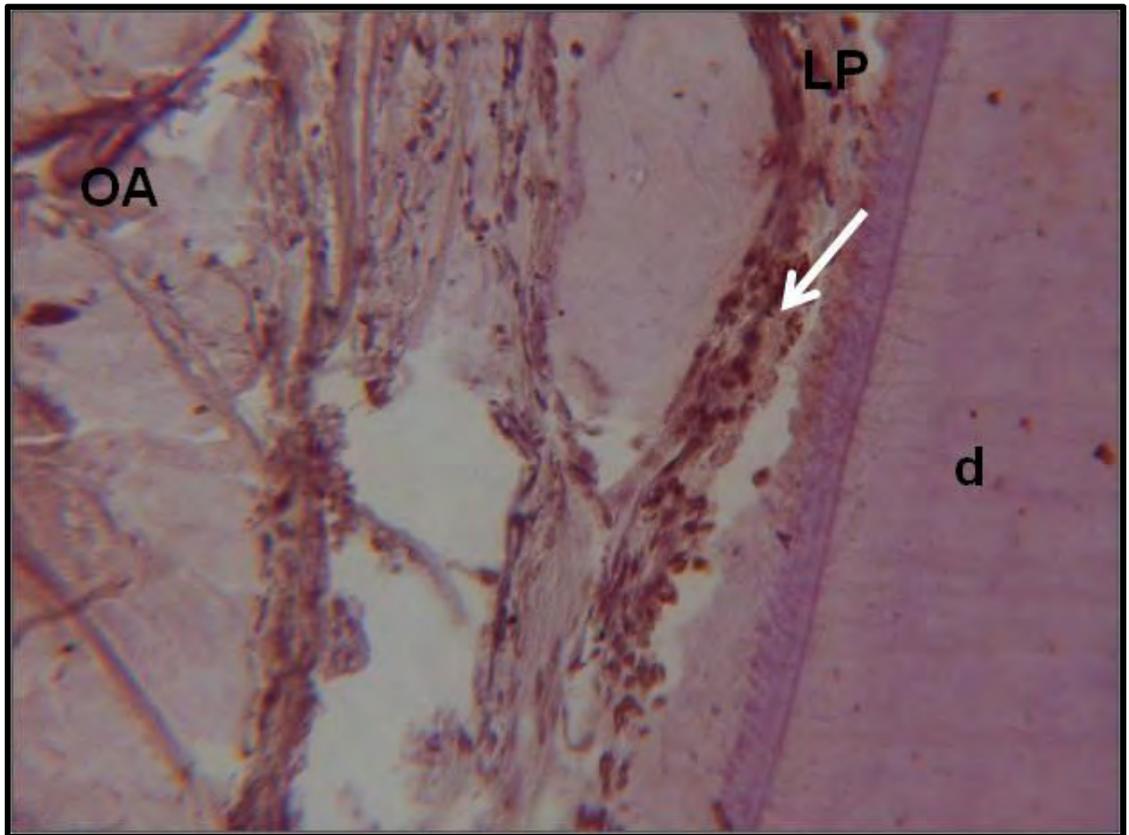


FIGURA 72- Grupo V (Células-tronco e Plasma Rico em Plaquetas). Área de anquilose com marcação positiva para a osteopontina (seta). Aumento de 40X. OA=Osso Alveolar; LP=Ligamento Periodontal; d=dentina.

As imunomarcações para as células de linhagem clástica foram muito observadas pelo anticorpo anti-TRAP nas regiões de superfície dentária e osso alveolar (Figura 73).



FIGURA 73- Grupo V (Células-tronco e Plasma Rico em Plaquetas). Imunomarcacões intensas para a linhagem de células clásticas em região da superfície radicular e no osso alveolar (setas). Aumento de 40X. OA=Osso Alveolar; d=dentina.

5.3 CARACTERIZAÇÃO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

A Figura 74 mostra o resultado de citometria de fluxo realizada com o material celular obtido por punção da medula da crista do osso íliaco do cão após adição do anticorpo anti-CD34 conjugado ao anticorpo secundário.

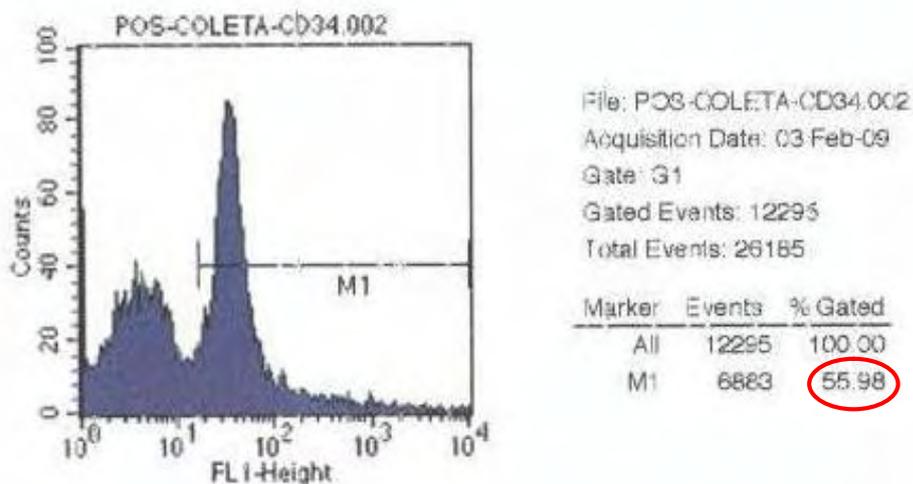


FIGURA 74- Citometria de fluxo realizada após punção ilíaca com adição de anti- CD34.

Os resultados mostram que aproximadamente 56% das células foram marcadas com o anticorpo anti-CD34, indicando que a maior parte das células-tronco pertenciam à linhagem hematopoiética.

A figura 75 mostra a análise de citometria de fluxo do material celular da medula óssea após a adição do anticorpo anti-CD90. Neste caso, foi necessário também realizar uma reação apenas com o anticorpo secundário (controle), já que o mesmo não encontrava-se conjugado ao anticorpo primário.

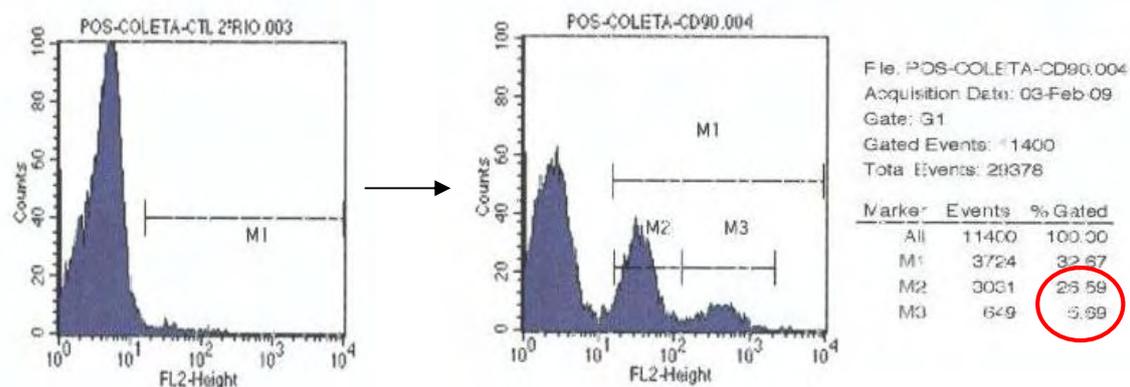


FIGURA 75- Citometria de fluxo realizada após punção ilíaca com adição apenas de anticorpo secundário (controle) (esq.) e com adição de anticorpo anti-CD90 (dir.).

Os resultados mostram a presença de duas populações distintas marcadas com este anticorpo, sendo a maior correspondendo a 26,59% e a menor de 6,69% do total de células presentes no material da coleta. Não houve marcações quando apenas o anticorpo secundário foi adicionado.

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

5.4.1 Análise Histomorfométrica

Para esta análise, os dados foram obtidos através da quantificação dos valores correspondentes à região das áreas de reabsorção de superfície, reabsorção por substituição e reabsorção inflamatória em relação à área total radicular de 12 cortes

representativos de cada grupo. Como a anquilose foi observada apenas em um espécime do grupo II, essa alteração foi excluída desta análise.

Após a quantificação em valores absolutos (mm²) através da análise histomorfométrica, esses valores foram transformados em valores relativos (em porcentagem) e submetidos à análise estatística. As tabelas contendo as medidas da área dentária total e das áreas comprometidas nos 5 grupos avaliados encontram-se no Anexo B. Os dados obtidos foram comparados pela análise de variância (ANOVA), seguido da análise comparativa pelo teste de Tukey quando a análise de variância sugeriu uma diferença significativa entre os grupos.

A Figura 76 mostra os valores relativos do comprometimento radicular quanto à ocorrência de reabsorção de superfície nos 5 grupos avaliados.

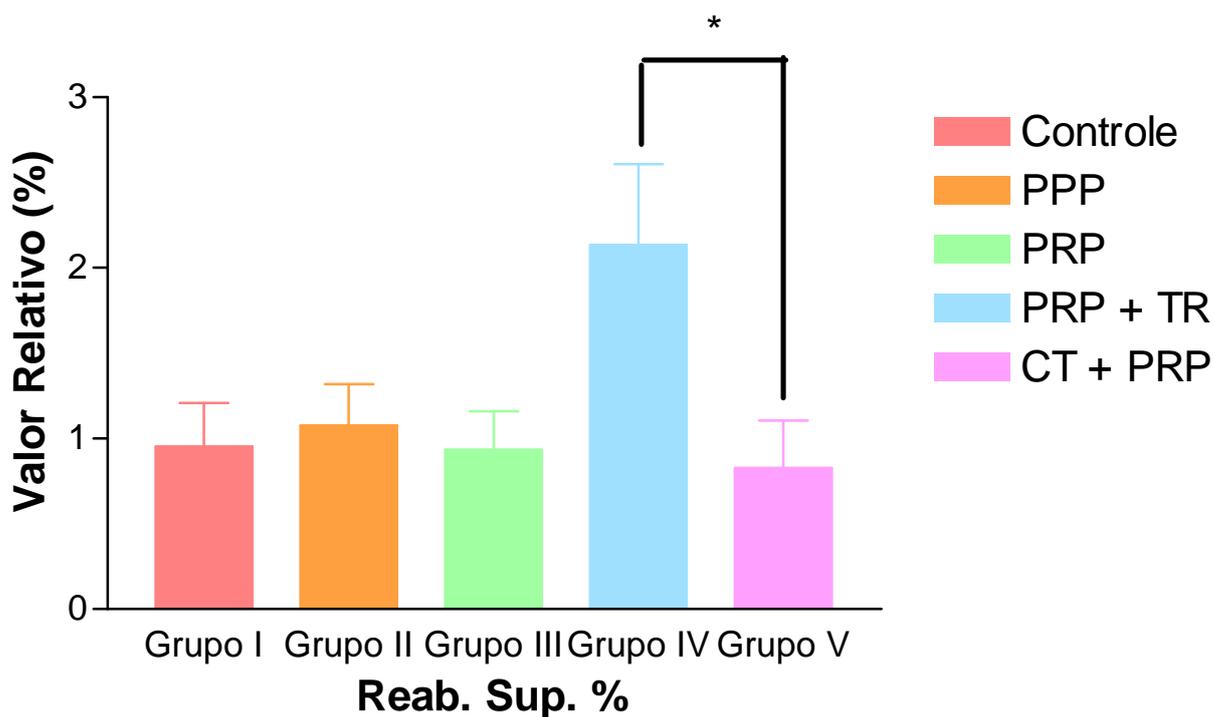


FIGURA 76- Comprometimento radicular quanto à ocorrência de reabsorção de superfície em valores relativos * estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

A análise de variância mostrou diferença estatisticamente significativa quanto à reabsorção de superfície ($p = 0.0256$; $p < 0.05$). A tabela 2 mostra as comparações individuais entre os grupos para esta alteração utilizando o teste *post-hoc* de Tukey.

Tabela 2- Teste de Tukey para comparações individuais entre os cinco grupos quanto à reabsorção de superfície

Comparação	p
Grupo I X Grupo II	>0,05 ns
Grupo I X Grupo III	>0,05 ns
Grupo I X Grupo IV	>0,05 ns
Grupo I X Grupo V	>0,05 ns
Grupo II X Grupo III	>0,05 ns
Grupo II X Grupo IV	>0,05 ns
Grupo II X Grupo V	>0,05 ns
Grupo III X Grupo IV	>0,05 ns
Grupo III X Grupo V	>0,05 ns
Grupo IV X Grupo V	<0,05*

* diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

A Figura 77 ilustra os valores relativos do comprometimento radicular quanto à ocorrência de reabsorção por substituição nos 5 grupos avaliados.

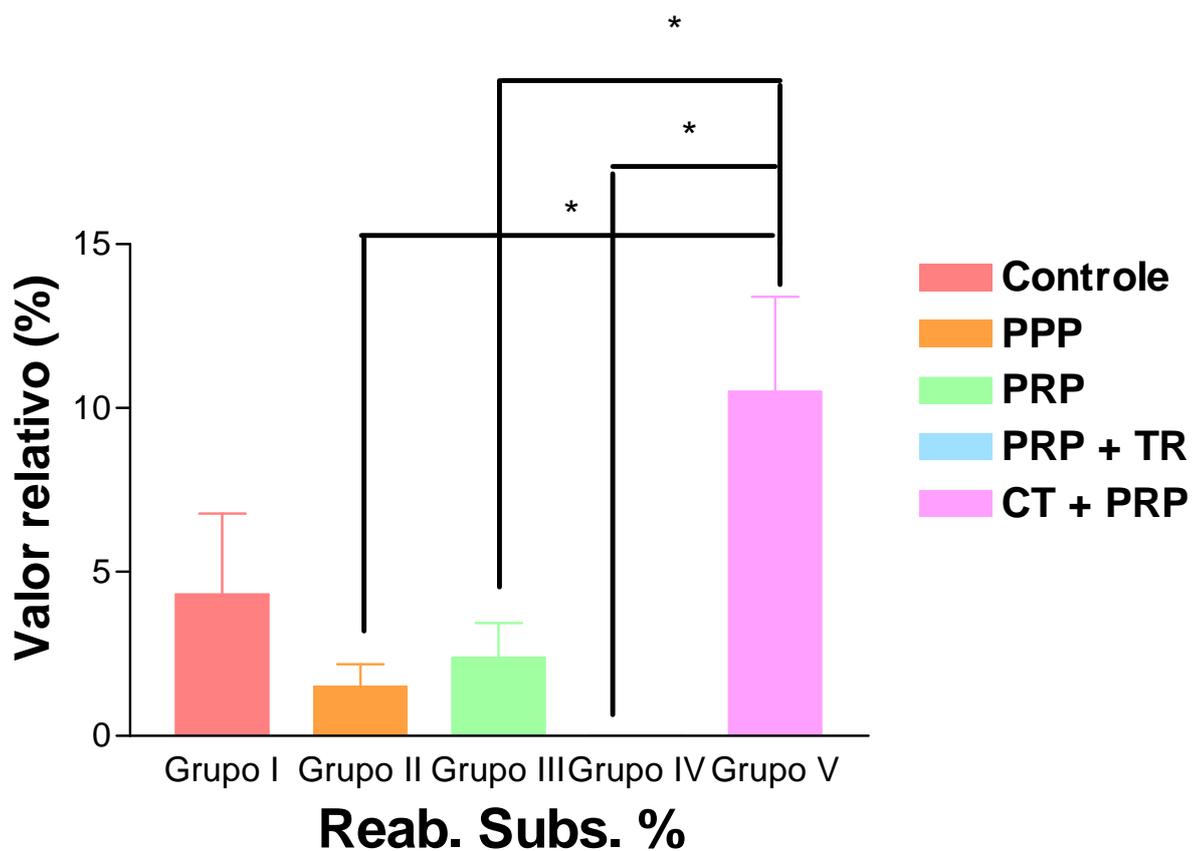


FIGURA 77- Comprometimento radicular quanto à ocorrência de reabsorção por substituição em valores relativos * estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

A análise de variância mostrou diferença estatisticamente significativa quanto à reabsorção por substituição ($p = 0,0015$; $p < 0,05$). A tabela 3 mostra as comparações individuais entre os grupos para esta alteração utilizando o teste *post-hoc* de Tukey.

Tabela 3- Teste de Tukey para comparações individuais entre os cinco grupos quanto à reabsorção por substituição

Comparação	p
Grupo I X Grupo II	>0,05 ns
Grupo I X Grupo III	>0,05 ns
Grupo I X Grupo IV	>0,05 ns
Grupo I X Grupo V	>0,05 ns
Grupo II X Grupo III	>0,05 ns
Grupo II X Grupo IV	>0,05 ns
Grupo II X Grupo V	<0,05*
Grupo III X Grupo IV	>0,05 ns
Grupo III X Grupo V	<0,05*
Grupo IV X Grupo V	<0,01*

* diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

A ocorrência de reabsorção inflamatória nos 5 grupos deste estudo é mostrada na Figura 78.

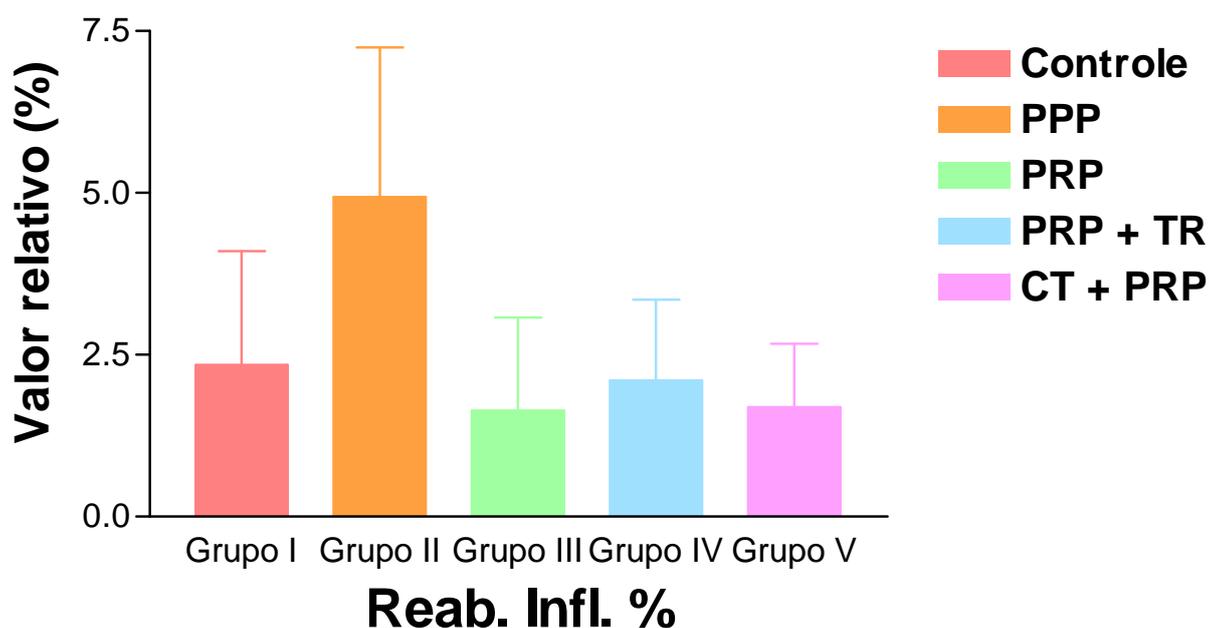


FIGURA 78- Comprometimento radicular quanto à ocorrência de reabsorção inflamatória em valores relativos.

Para esta alteração, o teste de ANOVA não mostrou diferença estatisticamente significativa quando os cinco grupos foram comparados ($p=0.5867$; $p>0.05$).

5.4.2 Análise de Imuno Histoquímica

Os escores obtidos pela análise das imunomarcações para os anticorpos anti-osteopontina e anti-TRAP nos cinco grupos, foram submetidos ao teste estatístico pela análise de variância (ANOVA). Quando havia diferença significativa, o teste de Tukey também foi aplicado para as comparações individuais entre os grupos.

A análise de variância mostrou diferença estatisticamente significativa para as imunomarcações para o anticorpo anti-osteopontina ($p=0.0015$; $p<0.05$). A tabela 4 mostra as comparações individuais entre os grupos para esta alteração utilizando o teste *post-hoc* de Tukey.

Tabela 4- Teste de Tukey para comparações individuais entre os cinco grupos quanto à imunomarcção pelo anticorpo anti-TRAP

Comparação	p
Grupo I X Grupo II	>0,05 ns
Grupo I X Grupo III	>0,05 ns
Grupo I X Grupo IV	>0,05 ns
Grupo I X Grupo V	>0,05 ns
Grupo II X Grupo III	<0,05*
Grupo II X Grupo IV	>0,05 ns
Grupo II X Grupo V	>0,05 ns
Grupo III X Grupo IV	>0,05 ns
Grupo III X Grupo V	>0,05 ns
Grupo IV X Grupo V	>0,05 ns

* diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Para as imunomarcções para o anticorpo anti-TRAP, a análise de variância não mostrou diferença estatisticamente significativa quando foram comparados os cinco grupos deste estudo ($p = 0.1671$; $p > 0.05$).

6 Discussão

O animal experimental escolhido para a realização desse trabalho foi o cão, pois sua utilização em pesquisas no reparo das estruturas periodontais, especialmente em reimplantes dentários, encontra-se já sedimentado na literatura. A escolha do tipo de animal a ser utilizado em uma pesquisa deve ser direcionada àquele cuja resposta biológica se assemelhe o máximo possível à resposta obtida no modelo humano, para que os resultados obtidos possam, de alguma forma, serem extrapolados para o homem (PITT FORD, 1985). No caso do cão, muitos autores comprovam esta semelhança quando se comparam estudos histológicos em polpas dentárias (HOLLAND et al., 2007; RUSSO; HOLLAND, 1974) e em estruturas de sustentação do dente (BOER et al., 2008; CUNHA et al., 1995; SONODA, 1997).

O momento ideal para a realização do tratamento endodôntico de dentes reimplantados é um dos pontos discutidos na literatura. Muitos autores preconizam o tratamento antes do reimplante pelo fato de que a reabsorção inflamatória possa ser causada pelo material necrótico que permanece no interior do canal radicular (ANDREASEN; HJÖRTING-HANSEN, 1966; COCCIA, 1980). A necrose pulpar ocorre em quase 100% de dentes reimplantados que apresentam rizogênese completa (DURR; SVEEN, 1987), justificando a realização do tratamento endodôntico em nosso

estudo. Também, optou-se, nesse modelo experimental, a realização deste procedimento em uma sessão anterior ao reimplante para que todas as variáveis relacionadas com complicações oriundas da polpa pudessem ser diminuídas ou anuladas, já que o objetivo do estudo relacionava-se ao reparo do ligamento periodontal. Além disso, a realização deste tratamento em uma sessão a parte evita a exposição do animal a uma sobre dose de anestésicos em razão de um procedimento cirúrgico mais longo. O hidróxido de cálcio foi o material de escolha para a realização deste tratamento devido à comprovada propriedade biológica, antimicrobiana e também por seu efeito inibidor de uma possível reabsorção inflamatória da raiz (ESTRELA, 1997; TRONSTAD et al., 1990).

O período de uma semana, utilizado no presente estudo, para a contenção dos dentes reimplantados normalmente é suficiente para assegurar uma sustentação periodontal adequada, uma vez que as fibras gengivais já estão reparadas neste intervalo (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001). Nasjleti et al. (1982), utilizando dois períodos diferentes de contenção – 7 e 30 dias, em dentes reimplantados de cães por um período extra-alveolar máximo de 30 minutos, observaram o restabelecimento do epitélio juncional, formação de fibras colágenas no espaço do ligamento periodontal e reabsorção por substituição limitada ao terço apical no grupo de 7 dias. Por outro lado, dentes reimplantados e mantidos em contenção por 30 dias, mostraram extensas áreas de reabsorção inflamatória e de anquilose.

Quanto ao tempo extra-alveolar de dentes avulsionados, foi provado que, após 15 minutos, as fibras do ligamento periodontal podem estar comprometidas,

aumentando o risco das reabsorções radiculares e influenciando no prognóstico do dente avulsionado (ANDREASEN; KRISTERSON, 1981). Além disso, para a integridade do ligamento periodontal fora do alvéolo, há a necessidade de um meio de conservação adequado (ANDREASEN, 1981b). Com a escassez de estudos que se assemelham a presente pesquisa, optamos por um tempo extra-alveolar intermediário, ou seja, de 30 minutos e sem a utilização de um meio de conservação, para que não houvesse muitas variáveis nesta fase inicial do estudo.

A proposta do período de eutanásia dos animais de 120 dias (4 meses) para observar a resposta tecidual pode ser considerada um período que se aproxime de um resultado mais definitivo quando comparado a períodos de observação menores. Segundo Nasjleti et al. (1975), a orientação final de fibras do ligamento periodontal não ocorre em um tempo menor de 4 meses. Estudos que avaliaram a resposta tecidual após reimplante de dentes permanentes em cães utilizaram períodos de 2, 3 ou 4 meses para a realização da eutanásia (CHEN et al., 2008; MORO, 2004; MURAD, 1982; TROPE; FRIEDMAN, 1992). Entretanto, sendo este um estudo de característica transversal, entendemos ser interessante, em outra oportunidade, a realização de grupos com períodos de observação diferentes para a análise das seqüência dos eventos que ocorreram até o resultado final, sendo de grande valia para uma melhor compreensão de algumas ocorrências observadas.

A manobra mecânica para a exodontia e para o reimplante não influencia negativamente no reparo (ANDREASEN, 1981b). Entretanto, como a ponta ativa do

fórceps pode promover um trauma na região cervical da raiz (OIKARINEN et al., 1996) e por outro lado, a região apical apresentar-se em forma de delta, o que poderia resultar em um processo inflamatório não relacionado à manobra cirúrgica, nos levou a considerar apenas a região dos 2/3 médios radiculares para as análises, excluindo-se, assim, as regiões cervicais e apicais.

Outro fator muito discutido entre pesquisadores quando da análise de cortes após reimplantes, é o sentido ideal destes cortes: longitudinal ou transversal. O corte dos espécimes no sentido transversal é capaz de fornecer dados relacionados às quatro superfícies dentárias (vestibular, lingual, mesial e distal), sendo que o tipo longitudinal oferece a visão de apenas dois lados do corte. Por outro lado, o corte transversal, quando não realizado de forma contínua, possui maior possibilidade de erros quanto à localização inicial ou final das alterações radiculares, podendo, inclusive causar uma certa "omissão" da ocorrência destas alterações. Em nosso estudo, optamos pelo corte longitudinal no sentido vestibulo-lingual por fornecer uma visão melhor de toda a extensão do ligamento periodontal. Apesar da ausência das superfícies mesial e distal no corte, entendemos que, resultados satisfatórios observados nas faces vestibular e lingual, reproduzem ainda melhores resultados nas faces mesiais e distais, já que, o terço médio do ligamento periodontal nas regiões vestibular e lingual, apresenta menor fluxo vascular e maior tendência a reabsorções devido à maior convexidade dessas superfícies (ANDREASEN, 1980a; ANDREASEN, 1980b; CASTELLI et al., 1980).

Excetuando o Grupo IV, observamos resultados menos satisfatórios nos dentes pré-molares devido à maior presença de reabsorções por substituição e inflamatória quando comparado aos incisivos. Esta falta de uniformidade dos resultados opõe-se aos achados de outros autores que também utilizaram estes dentes em estudos com reimplantes dentários (SAE-LIM et al., 1998; SOTTOVIA, 2007; TROPE; FRIEDMAN, 1992), porém não observaram esta diferença.

A ocorrência maior de reabsorções nos pré-molares poderia ser atribuída ao excesso de forças mastigatórias que é maior neste grupo de dentes. Em dentes com sobrecarga oclusal, ocorre necrose e exsudato inflamatório no espaço do ligamento periodontal e também no ligamento em si, promovendo a migração celular e diferenciação de células osteoblásticas que imediata e aceleradamente depositam a matriz óssea sobre a superfície radicular (CONSOLARO et al., 2005). Já a presença de reabsorção inflamatória pode estar relacionada à própria metodologia empregada de seccionamento das raízes dos pré-molares o que poderia causar a formação de nichos, facilitando o acúmulo de microorganismos nessas regiões.

Entretanto, de uma forma geral, a reabsorção inflamatória foi observada em poucos espécimes, demonstrando a efetividade do tratamento endodôntico realizado e da antibioticoterapia empregada (ANDREASEN, 1987; TRONSTAD, 1988). Trabalhos demonstram que o emprego de antibióticos em casos de reimplantes, especialmente a penicilina, favorece a diminuição de bactérias na superfície radicular, no canal pulpar e também no alvéolo, diminuindo, assim, o risco de reabsorções

radiculares (HAMMARSTRÖM et al., 1986, 1989). Em nosso estudo, utilizamos a espiramicina associada ao metronidazol já que a espiramicina, por ser um macrolídeo, possui um espectro similar a penicilina e o metronidazol é também eficaz contra bactérias anaeróbias presentes nas periodontopatias (MONTGOMERY, 2000). Além disso, o medicamento escolhido é recomendado especificamente para o pré e pós-operatório de intervenções da cavidade oral e faringiana de cães e gatos.

A utilização dos materiais em animais diferentes baseia-se no fato de que o plasma é uma substância que é absorvida pelo organismo. Caso fossem utilizados materiais diferentes no mesmo animal, um poderia interferir na ação do outro, dificultando a análise dos resultados. Também por esse motivo, optamos por utilizar o material em uma arcada e a outra servir como controle, diminuindo o risco desta interferência. Trabalhos na literatura não observaram diferenças quanto à presença de reabsorções em dentes da maxila comparado aos da mandíbula (ANDREASEN, 1980c; BLÖMLOF et al., 1983). Da mesma forma, não observamos diferença nas respostas de dentes superiores quando comparado aos inferiores, viabilizando a metodologia empregada deste estudo quanto a este aspecto.

Procuramos também averiguar as diferenças no reparo tecidual nos diferentes grupos deste estudo por meio de imunomarcações de anticorpos específicos de componentes envolvidos na formação óssea e nos processos de reabsorção. A osteopontina é uma proteína da matriz óssea que é sintetizada pelos pré-osteoblastos, osteoblastos e osteócitos. A expressão desta proteína em estágios

iniciais da formação óssea mostra sua importância na formação deste tecido (BUTLER, 1989), sugerindo assim, reparos com formação de tecido ósseo após o reimplante. Por outro lado, imunomarcações para a fosfatase ácido tartarato resistente (TRAP) indicam alta atividade de células de linhagem clástica já que trata-se de uma enzima lisossômica presentes nos odontoclastos e osteoclastos (MINKIN, 1982; SAHARA et al., 1996). Sendo assim, imunomarcações positivas para a TRAP nos tecidos após reimplantes dentários sugerem maior reabsorção por células pertencentes a essas linhagens.

O Grupo I caracterizou o grupo controle, onde nenhum tipo de material foi empregado nestes dentes. Alguns espécimes deste grupo apresentaram certa integridade na dentina e cimento, com a presença de cimento secundário neoformado em áreas de reabsorção. No estudo de Sottovia (2007), as maiores alterações foram encontradas no grupo que fora mantido em meio seco, com a presença de extensas áreas de reabsorções por substituição e inflamatórias. Entretanto, neste estudo, foi utilizado um período extra-alveolar de 2 horas. No presente estudo, a integridade observada em alguns espécimes mantidos em meio seco pode ser relacionada ao tempo extra-alveolar mais curto.

Por outro lado, este grupo foi o segundo onde a reabsorção por substituição foi mais observada (Figura 77). Esta alteração foi também evidenciada através das imunomarcações positivas para osteopontina presentes no ligamento periodontal. A reabsorção por substituição está fortemente relacionada à presença de um ligamento

periodontal não vital sobre a superfície radicular (ANDREASEN; KRISTERSON, 1981). Nevins et al. (1980) asseveram que com um período extra-alveolar de 20 minutos, o reimplante já se encontra comprometido. Andreasen (1981a) observou que até 18 minutos em meio seco, o dente avulsionado apresentava 70% de ligamento periodontal com vitalidade, reduzindo para 30% quando o período atingia 30 minutos. Este fato pode explicar a maior prevalência da reabsorção por substituição neste grupo.

Durante o preparo do plasma pobre em plaquetas (PPP) e plasma rico em plaquetas (PRP), a contagem de plaquetas após a segunda centrifugação resultou em um aumento de 3 a 5 vezes do número destas células na fração do PRP quando comparado a contagem inicial do sangue periférico. Marx et al. (1998) realizaram o primeiro estudo mostrando uma melhora significativa de defeitos mandibulares com a utilização do PRP. Neste estudo, o PRP apresentava uma contagem de 3 a 4 vezes maior de número de plaquetas quando comparado a contagem inicial do sangue periférico. Altas concentrações de PDGF e TGF- β capazes de aumentar a proliferação de células do ligamento periodontal foram encontradas no PRP cuja concentração de plaquetas era 3 vezes maior da quantidade inicial (OKUDA et al., 2003). Marx (2004) define como um "PRP terapêutico" em humanos aquele que possui aproximadamente 1.000.000 de plaquetas/ μ l de sangue, considerando que os seres humanos apresentam cerca de 200.000 ± 75.000 plaquetas/ μ l no sangue periférico. Por outro lado, estudos têm demonstrado que concentrações maiores de plaquetas no PRP podem inibir o efeito de proliferação celular (HAN et al., 2007; LIU et al., 2002).

De uma forma geral, encontramos bons resultados nos espécimes do Grupo II, apresentando ausência de reabsorção por substituição e reabsorção inflamatória em 8, dos 12 cortes analisados por histomorfometria. O Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) é um material rico em fibrinogênio, originando também outra nomenclatura dada a esse material que é *Plasma Rico em Fibrinogênio (PRF)* (CHAGAS et al., 2004) e também é considerado uma cola de fibrina autóloga (FLORYAN, BERGHOFF, 2004). O fibrinogênio é convertido pela trombina autógena em fibrina (GOTTRUP; ANDREASEN, 2001; SANTOS; SANTOS, 2004; SILVER et al., 1995), e desempenha importantes papéis na cicatrização, incluindo indução da angiogênese (DVORAK et al., 1987), quimiotaxia de monócitos (DVORAK et al., 1987) e migração de fibroblastos (KNIGHTON et al., 1982). Opondo-se a esses resultados, Pearson et al. (1988) asseveram que a fibronectina obtida de forma exógena seria de pouca aplicação já que, segundo os autores, o sangramento causado durante o ato cirúrgico já possui quantidade adequada para a adesão celular.

Derivados do sangue foram utilizados em reimplantes dentários em alguns estudos e incluem o plasma liofilizado autólogo (NEASJLETI et al., 1986), concentrado de proteína alógena de fibrina e fibronectina (RIPAMONTI; PETIT, 1989) e fibronectina (NASJLETI et al., 1987a). Destes trabalhos, o plasma liofilizado e o concentrado de fibrina são os que mais se assemelham a composição do PPP. No estudo de Nasjleti et al. (1986), os autores observaram que a utilização do plasma liofilizado reconstituído em solução salina aumentava a proliferação celular dos tecidos de conexão, reduzia a resposta inflamatória e inibia reabsorções radiculares.

Entretanto, o tempo extra-alveolar utilizado na referida pesquisa foi de apenas 5 minutos, diferentemente de nosso caso, onde o tempo de 30 minutos em meio seco já representa um ligamento periodontal com apenas 30% de vitalidade (ANDREASEN, 1981a). Entendemos, com isso, que os resultados favoráveis apresentados no presente estudo são mais significativos em função do maior comprometimento das células do ligamento periodontal.

Por outro lado, o Grupo II foi aquele onde o maior índice de reabsorção do tipo inflamatória foi observado (Figura 78), sendo esta ocorrência confirmada pelas imunomarcações do anticorpo anti-TRAP, mostrando, inclusive uma relação estatisticamente significativa quando comparado ao Grupo III (Tabela 4). Entretanto, essa diferença não foi significativa para os resultados da análise histomorfométrica quando o teste estatístico foi aplicado. Também neste grupo, foi observado imunomarcações da osteopontina para células da linhagem osteoclástica. Embora a osteopontina seja uma matriz da proteína óssea observada principalmente em células osteoblásticas, pode também marcar células de linhagem clástica (ASOU et al., 2001), confirmando o efeito parácrino dos osteoblastos sobre a atividade osteoclástica.

De maneira interessante, neste grupo, os mesmos espécimes que apresentaram a reabsorção inflamatória foram aqueles que também demonstraram a reabsorção por substituição durante a análise histomorfométrica, sendo todos dentes pré-molares. O fibrinogênio adsorvido aparece como uma proteína de reação

inflamatória aguda, funcionando como substância indutora da ação do receptor CD11B aos macrófagos e neutrófilos (SANTOS; SANTOS, 2004). Esse fator poderia explicar o aumento de reações inflamatórias neste grupo. Por outro lado, como foi observada em grande parte dos grupos uma heterogeneidade de respostas entre pré-molares e incisivos, esta explicação não pode ser conclusiva de maneira isolada.

Ripamonti e Petit (1989), em um estudo em babuínos, observaram respostas de anquilose em dentes com superfícies radiculares tratadas com ácido cítrico e reimplantados com concentrado de proteína alógena de fibrina e fibronectina. Os autores conferem parcialmente essa resposta com a metodologia empregada no estudo, onde os ápices radiculares foram cortados previamente ao reimplante, reduzindo o espaço entre a raiz e o osso alveolar e favorecendo a colonização de células produtoras de osso derivadas dos espaços medulares. Contrariando esses achados, a reabsorção por substituição não foi um achado comum entre os espécimes reimplantados com o PPP.

A anquilose foi observada em apenas um espécime do Grupo II. Embora o termo "anquilose" seja referido, muitas vezes, como o crescimento ósseo adentrando as cavidades reabsorvidas da raiz (ANDERSSON et al., 1984), a verdadeira anquilose está relacionada com a fusão do osso alveolar ao tecido duro dentário, podendo ou não estar associado à reabsorção radicular. Na ausência de áreas não vitais de ligamento periodontal maiores do que quatro milímetros quadrados (ANDREASEN; KRISTERSON, 1981), o cimento e a dentina são gradualmente absorvidos e

invadidos pelo tecido ósseo (HAMMARSTRÖM et al., 1989), caracterizando a reabsorção por substituição (ANDERSSON; MALMGREN, 1999).

A estratégia terapêutica do plasma rico em plaquetas (PRP) fundamenta-se na aceleração da cicatrização por meio da concentração de fatores de crescimento, iniciadores universais de quase todos os eventos cicatriciais (LENHARO; MENDONÇA, 2002). Entretanto, para que ocorra a manutenção dos fatores de crescimento no local desejado, é necessário que o PRP se encontre na forma de gel (DELWICHE et al., 1985). Porém, a separação dos hemocomponentes do PRP só é possível antes da formação do coágulo, onde, para isso, o anticoagulante é utilizado durante a coleta. A ação deste anticoagulante é então neutralizada no momento da utilização clínica por substâncias que possibilitam a formação do coágulo, sendo que, as mais utilizadas são a associação de cloreto de cálcio e trombina bovina (MARX et al., 1998) ou somente o cloreto de cálcio (LEÃO, 2002). Como os resultados na literatura que utilizam os dois protocolos ainda são controversos, decidimos por analisar a ação do PRP ativado por ambos os protocolos.

Quando analisados os resultados dos dentes reimplantados com o plasma rico em plaquetas ativado pelo cloreto de cálcio (Grupo III), observamos alguns espécimes com uma boa resposta de reparo das estruturas periodontais, porém com uma tendência à substituição do espaço periodontal por tecido ósseo neoformado, fato este confirmado também pelas imunomarcações positivas para osteopontina, que foram pronunciadas neste grupo. A reabsorção por substituição foi observada

em 5 dos 12 cortes analisados por histomorfometria. Por outro lado, 7 espécimes apresentaram ausência total deste tipo de reabsorção, observando-se apenas o estreitamento da região do ligamento periodontal devido à presença de cimento secundário e osso neoformado.

O Plasma Rico em Plaquetas apresenta em sua constituição básica o plasma, leucócitos e plaquetas (MARX, 1999). As plaquetas, por sua vez, possuem os grânulos α -plaquetários, responsáveis pela liberação dos fatores de crescimento quando ocorre a granulação plaquetária, entre os quais podemos citar o PDGF, TGF β , o VEGF e o EGF (MARX, 2001). Estes fatores de crescimento agem como sinalizadores para a proliferação e migração de células ativas no processo de cicatrização (GOTTRUP, ANDREASEN, 2001), sendo o TGF- β e o PDGF os mais importantes fatores de crescimento presentes no local da cicatrização durante as fases iniciais desse processo (EVERTS et al., 2006).

Estudos mostram que o TGF- β é responsável pela ação e ativação dos fibroblastos (STEENFOS et al., 1990) e o PDGF, além da ativação dessas células, é também responsável pela migração ordenada dos fibroblastos no local da ferida (DEUEL; HUANG, 1984). Por outro lado, o PDGF aumenta a proliferação de células ósseas e contribui na regeneração óssea através da mitogenese osteoblástica (EVERTS et al., 2006) e o TGF- β tem um grande potencial no reparo ósseo, já que essas células possuem receptores para essa molécula. Também se, por um lado, a associação do PDGF e TGF- β são promovedores de síntese de colágeno e

proliferação de fibroblastos (LYNCH et al., 1989a), por outro, a combinação desses fatores de crescimento também estão relacionados com a diferenciação e proliferação de osteoblastos em células osteogênicas (ROBEY et al., 1987). Diante da ação dos múltiplos fatores de crescimento presentes nas células plaquetárias os quais agem sob diferentes vias em diferentes populações celulares (VAN DEN DOLDER et al., 2006), isto poderia sugerir uma competição celular na presença desses peptídeos durante o reparo, contribuindo para os dois tipos de respostas teciduais observados no grupo III.

Embora a utilização do PRP em Odontologia esteja fortemente relacionado com a regeneração óssea (MACEDO, 2004), estudos recentes têm empregado o uso dessa substância na cicatrização da mucosa oral (LINDEBOOM et al., 2007) e no reparo de estruturas periodontais como um todo, como foi o caso de Tozüm et al. (2006) e Demir et al. (2007) que utilizaram esse material em reimplantes intencionais, observando resultados satisfatórios no reparo dessas estruturas. Segundo Marx (2001), o PRP não é ósseo-indutor e não pode induzir neoformação óssea. O PRP age na cicatrização pela sua capacidade de aumentar o número de células (mitogênese) e estimular o crescimento vascular (angiogênese). Entendemos, assim, que a presença dos fatores de crescimento no PRP que, por sua vez, influencia vários grupos celulares, assegura sua viabilidade em reparo de outros tecidos que não seja o tecido ósseo.

A vida média de uma plaqueta em uma ferida e o período de influência direta de seus fatores de crescimento está em torno de 5 a 8 dias (EVERTS et al., 2006; MARX, 2001). Assim que as plaquetas são ativadas, em 10 minutos secretam 70% dos seus fatores de crescimento e próximo a 100% na primeira hora, continuando a sintetizar quantidades adicionais de fatores de crescimento por aproximadamente 8 dias, seu tempo médio de vida (MARX, 2001). Coincidentemente, este é o período onde a proliferação dos tecidos de conexão atinge o seu pico máximo em reimplantes dentários (NASJLETI et al., 1975).

Surpreendentemente, quando utilizamos o PRP ativado com a associação de trombina de origem bovina e cloreto de cálcio (Grupo IV), não observamos, em nenhum espécime, a reabsorção por substituição (Figura 77). Por outro lado, a reabsorção de superfície foi o tipo mais observado, sendo estatisticamente significante quando comparado ao Grupo V, onde as referidas reabsorções foram menos evidentes (Tabela 2). Entretanto, a análise histológica revelou que, a maioria dessas reabsorções encontrava-se inativa e reparada com cimento secundário. Esses dados foram confirmados através das imunomarcações mais discretas com o anticorpo anti-TRAP neste grupo.

As reabsorções de superfície são consideradas auto-limitantes, apresentando um reparo com cimento neoformado (ANDREASEN; ANDREASEN, 2001), representando, assim, pouco significado clínico quanto ao prognóstico de dentes reimplantados. Andreasen (1981b) demonstrou que este tipo de reabsorção é mais comum em dentes avulsionados e armazenados em solução salina, saliva ou água

em períodos de 8 a 120 minutos quando comparado a dentes mantidos em meio seco. Uma das explicações para esse fenômeno é de que locais de reabsorções de superfície poderiam ser ocupadas por outros tipos de reabsorção, ou seja, substitutivas e inflamatórias. O tempo de observação deste estudo, sendo após 120 dias do reimplante, anula essa possibilidade, já que, as reabsorções dos tipos substitutiva e inflamatória, podem ser observadas histologicamente após um período, respectivamente de duas semanas e uma semana (ANDREASEN, 1980a,1980c).

Contrariando as observações histológicas e a análise histomorfométrica, as imunomarcações para a osteopontina foram bastante intensas no grupo IV, sugerindo uma tendência do reparo por tecido ósseo. Entretanto, a osteopontina é uma proteína que também tem a capacidade de ligar-se não somente aos receptores de superfície dos osteoblastos, mas aos componentes da matriz extracelular em especial o colágeno tipo I e a fibronectina (DENHARDT; GUO, 1993; KAARTINEN et al., 1999) e também a linhagens de fibroblastos (DENHARDT; GUO, 1993). Além disso, estudos demonstram a presença da osteopontina também na região do cimento (LAO et al., 2006; STASZYK; GASSE, 2007). Estes aspectos podem explicar a intensa marcação observada nos espécimes do Grupo IV, em regiões de ligamento periodontal e superfícies radiculares íntegros.

Para entender a ausência de reabsorções por substituição e a presença de feixes de fibras colágenas organizadas, resultando em reparo com a formação de um ligamento periodontal normal no Grupo IV, nos levou a buscar estudos na literatura

que tratassem do único material presente neste grupo e ausente nos demais: a trombina.

A trombina ou fator II ativado é uma proteína do tipo protease serina e realiza um papel fundamental na ativação da cascata de coagulação e na indução da formação da matriz de fibrina e no coágulo sanguíneo. A trombina é considerada a mais potente substância coagulante conhecida, sendo capaz de converter fibrinogênio em fibrina e ativar a agregação plaquetária em uma ferida (FENTON, 1988; SANTOS; SANTOS, 2004). Além dessas propriedades, estudos demonstram que a trombina pode ser liberada a partir de um coágulo de fibrina e causar ativação ou estimular a proliferação de células teciduais adjacentes, incluindo monócitos e macrófagos (BAR-SHAVIT et al., 1983), células musculares lisas (BERK et al., 1991), células endoteliais (HERBERT et al., 1994) e fibroblastos (DAWES et al., 1993).

Chan et al. (1998) investigaram, *in vitro*, o efeito da trombina no comportamento de células derivadas do ligamento periodontal (LP), procurando também melhor elucidar o papel dessa substância no processo de reparo do tecido periodontal. A função da trombina foi analisada quanto ao crescimento das células do LP, adesão dos fibroblastos do LP à fibronectina e colágeno tipo I, produção da fosfatase alcalina e morfologia dos fibroblastos do LP. Foi observado que a trombina foi capaz de estimular o crescimento dos fibroblastos, aumentar a síntese de colágeno e causar significantes alterações morfológicas nessas células, provocando uma maior união entre as células, alterações na orientação das fibras e aumento do

espaço intercelular. Por outro lado, não aumentou a adesão à fibronectina e colágeno quando os fibroblastos foram pré-tratados com a trombina e exibiu pouco efeito na produção de atividade da fosfatase alcalina por essas células. Esses resultados *in vitro* podem explicar os fenômenos ocorridos *in situ* em nosso estudo, não somente quanto à formação de fibras colágenas, mas também quanto à ausência de substituição do ligamento periodontal por tecido ósseo, já que a taxa de fosfatase alcalina, um marcador de diferenciação de células para formar tecidos mineralizados, não aumentou com o uso da trombina.

Chen e Buchanan (1975) já haviam observado o efeito da trombina em fibroblastos através do aumento na proliferação e migração dessas células. Esses resultados foram confirmados por Dawes et al. (1993), onde observaram que a trombina causa a quimiotaxia de fibroblastos e conseqüente migração celular na mesma dosagem que o PDGF. O tempo extra-alveolar de 30 minutos do presente estudo poderia resultar em algum remanescente de células do ligamento periodontal, que em contato com a trombina, causaria um aumento do número de fibroblastos e migração dessas células para regiões da raiz desprovidas de ligamento. A presença de receptores para a trombina em células do ligamento periodontal foi demonstrada no estudo de Chan et al. (1988).

Os resultados promissores com a utilização do PRP em Engenharia Tecidual em associação com as células-tronco, nos motivou a realização de outro grupo experimental. A medula óssea é um tecido que contém células-tronco

hematopoiéticas, as quais são capazes de gerar as células sanguíneas e células-tronco mesenquimais, com capacidade de gerar outros tipos celulares, como osteoblastos, condroblastos, mioblastos e células nervosas (BIANCO et al., 2001; GRONTHOS et al., 2006; PONTIKOGLOU et al., 2008). Para que as células-tronco mesenquimais desempenhem seu papel terapêutico, precisam estar em um espaço apropriado e com sinais específicos para serem capazes de se diferenciarem e sintetizarem uma matriz extracelular de volume suficiente e de integridade funcional (SCHELLER et al., 2009). O PRP, por ser rico em fatores de crescimento, é um material que tem sido usado como arcabouço para estas células visando à regeneração de tecidos periodontais (ITO et al., 2006; YAMADA et al., 2004, 2006).

A aplicação clínica do uso de células-tronco mesenquimais da medula óssea é limitada devido ao pequeno número destas células com potenciação de diferenciação presentes nesse tecido (1 em 10^5 células nucleadas) em doadores jovens, sendo que esse número diminui com a idade (LUCARELLI et al., 2003). Para que essas células possam ser usadas na regeneração de tecidos, as células precisam passar por um processo de expansão ou proliferação para serem posteriormente semeadas no arcabouço apropriado (PITTENGER et al., 1999). No presente estudo, a proliferação *in vitro* das células não foi realizada para que houvesse uma maior proximidade com a realidade clínica do trauma dentário. Sendo assim foram utilizadas todas as células presentes na fração mononuclear do material da medula óssea. Estudos relataram bons resultados na utilização dessa fração celular no reparo de diversos tipos de tecidos (FILHO CERRUTI et al., 2007; OLIVEIRA, 2008; STRAUER et al., 2002).

As células-tronco expressam proteínas de superfície que podem ser reconhecidas por anticorpos específicos e, portanto podem ser utilizados na caracterização dessas células. Estudos mostram que as células-tronco mesenquimais expressam os anticorpos CD13, CD29, CD44, CD73, CD90 e CD105, mas não expressam CD11, CD31, CD45 e CD235. Em adição a isso, é consenso que estas células são negativas para CD34. O CD34 tem sido muito utilizado como marcador para a linhagem hematopoiética (COPLAND et al., 2007; DELORME, CHARBORD, 2007; DVORAKOVA et al., 2008). A presença de células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais no material coletado da medula óssea foi confirmada através da citometria de fluxo, mostrando uma maior porcentagem de células-tronco da linhagem hematopoiética neste material (Figuras 74 e 75).

A fração de células mononucleares obtidas da medula óssea contém células-tronco hematopoiéticas, progenitoras endoteliais e, em menor número, células-tronco mesenquimais (STRAUER et al., 2002). Duas populações distintas foram detectadas dentro da região positiva (M1) através de citometria de fluxo devido às diferenças de intensidade de expressão do anticorpo CD90 (Figura 75). Esses dados sugerem que a população maior corresponde às células estromais presentes na fração mononuclear e que também são positivas para esse marcador. A glicoproteína CD90, conhecida também como Thy-1 (antígeno 1 de diferenciação do timócito), é um marcador de superfície de neurônios, timócitos, algumas linhagens de fibroblastos e células mesangiais. Entre as células da medula óssea, algumas linhagens positivas para o CD34, também são expressas pelo marcador CD90, além

das células endoteliais, presentes no estroma medular, expressam esse marcador (BRADLEY et al., 2009). Até o presente momento, apesar dos esforços dos pesquisadores, ainda não foi possível definir o marcador ou marcadores específicos que poderiam identificar, de maneira inequívoca, uma população de células-tronco mesenquimais dentro de uma população celular heterogênea como o estroma medular (HUGHES et al., 2006).

Moioli et al. (2007) ressaltam que, em se tratando da engenharia tecidual do periodonto, deve haver a restauração do ligamento periodontal com suas fibras em conexão com a superfície radicular e osso alveolar, bem como regeneração do cimento e reparo do osso alveolar. Entretanto, os resultados observados na análise histomorfológica no Grupo V mostraram, neste grupo, o maior número de espécimes com tecido ósseo neoformado em contato com área de dentina reabsorvida. Esses dados foram confirmados pela análise histomorfométrica, onde a reabsorção por substituição foi maior neste grupo (Figura 77), apresentando diferença estatisticamente significativa em relação aos demais, com exceção do grupo controle (Grupo I) (Tabela 3). Também as imunomarcações para a osteopontina através da análise de imuno histoquímica foram bem evidentes neste grupo.

As diferenças entre os Grupos III e V quanto à presença da reabsorção por substituição sugere alguma influência das células da medula no aumento do reparo por tecido ósseo no Grupo V, já que, a metodologia para ativação do PRP foi a mesma utilizada nos dois grupos. Mesmo encontrando-se em um número reduzido, as células-tronco mesenquimais poderiam ter sofrido a ação dos fatores de

crescimento presentes no PRP, colaborando para a diferenciação dessas células em células osteoblásticas. Semelhantemente, em um estudo *in vivo*, Filho Ferrucci et al. (2007), observaram neoformação de tecido ósseo com a utilização de células mononucleares da medula óssea, isto é, hematopoiéticas e mesenquimais associadas ao PRP. Neste estudo, após a avaliação *in vitro*, os autores conferem o ganho ósseo às células mesenquimais presentes na fração mononuclear do material da medula óssea. Acreditamos ser de extrema importância, em um próximo estudo, a marcação das células com proteínas fluorescentes, possibilitando analisar o comportamento das mesmas de maneira mais detalhada como relatado nos estudos de De Kok et al. (2005) e Hasegawua et al. (2006).

Os fatores de crescimento envolvidos na formação óssea podem diferenciar células-tronco mesenquimais indiferenciadas em células osteoprogenitoras imaturas e maduras na presença de proteínas morfogenéticas do osso (BMPs). Essas proteínas pertencem a super família dos fatores de transformação beta (TGF- β), que, por sua vez, encontra-se presente no PRP (EVERTS et al., 2006). A utilização de marcadores específicos associados à expressão de fosfatase alcalina tem demonstrado a presença de células osteoprogenitoras presentes na medula óssea, que se diferenciam em osteoblastos na presença de fatores de crescimento, incluindo TGF- β , FGF, PDGF e IGF (HUGHES et al., 2006), os quais são liberados pelos grânulos α -plaquetários durante a fase de degranulação (EVERTS et al., 2006). Com base nas observações da presente investigação, o PRP ativado por cloreto de cálcio não poderia ser indicado como um suporte (*scaffold*) apropriado para a regeneração do ligamento periodontal após o reimplante dentário, devido a maior formação de tecido

ósseo neste grupo. Levando-se em conta a espessura do ligamento periodontal (0,25mm), outros tipos de materiais poderiam ser testados para servir como arcabouço das células indiferenciadas como as esponjas de colágeno (NAKAHARA et al., 2004), gel de colágeno (MIMURA et al., 2008), membranas de colágeno (NAKAHARA et al., 2003) e também o próprio PRP ativado pela mistura de trombina bovina e cloreto de cálcio pelos bons resultados mostrados na presente pesquisa.

Ao término desta discussão, diante dos resultados satisfatórios encontrados em alguns dos materiais utilizados nesta pesquisa e no vasto horizonte das possibilidades que a aplicação da engenharia tecidual traz para a regeneração de tecidos danificados por traumas, algo que permeia nossa mente é a seguinte pergunta: será possível transferir os dados experimentais aqui expostos para a realidade clínica? Apesar dos desafios, a utilização do PPP e PRP é algo totalmente viável e já utilizado em ambulatórios odontológicos de forma rotineira. Também a terapia celular nas doenças periodontais é hoje uma realidade que já não pode ser ignorada. Mesmo ainda necessitando de alguns refinamentos metodológicos e maiores validações científicas dos achados aqui reportados através de fases seqüenciais deste estudo inédito para o tratamento da avulsão dentária, ansiamos que, ao final deste trabalho, a presente pesquisa possa trazer inovações não somente para a área de Traumatologia Dentária, mas também para o aprimoramento de um assunto tão explorado na atualidade que é o uso de células-tronco na terapêutica de tecidos lesados por doenças e traumas.

7 Conclusão

Dentro dos limites desse estudo, de acordo com a metodologia empregada e baseado nos resultados obtidos podemos concluir que:

- O Plasma Pobre em Plaquetas foi capaz de promover o reparo do ligamento periodontal, porém mostrou áreas de reabsorção inflamatória em 35% dos espécimes analisados, no entanto, sem diferença estatisticamente significativa com os demais grupos;
- O Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio foi capaz de gerar reparo do ligamento periodontal, porém com uma tendência ao reparo por substituição óssea em 41% do total de espécimes deste grupo;
- A utilização do Plasma Rico em Plaquetas ativado por trombina de origem bovina e cloreto de cálcio apresentou os melhores resultados, observando-se áreas de reparo do ligamento periodontal e ausência de reabsorção por substituição, apresentando, no entanto, maior quantidade de áreas com reabsorção de superfície inativas em 90% dos espécimes;
- O Grupo das células-tronco mononucleares da medula óssea associadas ao PRP foi aquele que apresentou as maiores áreas de reabsorção por substituição em 67% dos espécimes, sendo essa diferença

estatisticamente significativa quando comparado aos demais grupos, exceto com o Grupo controle.

*Referências**

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. 544 p.

ALEXANDER, P.C. Replantation of teeth. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, St. Louis, v.9, n.1, p. 110-114, 1956.

ANDERSSON, L.; BODIN, I. Avulsed human teeth replanted within 15 minutes- a long term clinical follow up study. *Endod. Dent. Traumatol.*, Copenhagen, v.6, n.1, p.37-42, 1990.

ANDERSSON, L.; MALMGREN, B. The problem of dentoalveolar ankylosis and subsequent replacement resorption in the growing patient. *Aust. Endod. J.*, Melbourne, v. 25, n.2, p. 57-61, 1999.

ANDERSSON, L. et al. Tooth ankylosis. Clinical, radiographic and histological assessments. *Int. J. Oral Surg.*, Copenhagen, v.13, n.5, p.423-431, 1984.

ANDREASEN, J.O. Analysis of pathogenesis and topography of replacement root resorption (ankylosis) after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Swed. Dent. J.*, Jönköping, v.4, n 6, p.231-240, 1980a.

ANDREASEN, J.O. Analysis of topography of surface- and inflammatory root resorption after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Swed. Dent. J.*, Jönköping, v. 4, n. 4, p.135-144, 1980b.

* Normalização segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT – NBR 6023/2002

ANDREASEN, J.O. 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.*, Copenhagen, v.10, n.1, p.43-53, 1981a.

ANDREASEN, J.O. Experimental dental traumatology: development of a model for external root resorption. *Endod. Dent. Traumatol.*, Copenhagen, v.3, n. 6, p. 269-287, 1987.

ANDREASEN, J.O. Periodontal healing after replantation and autotransplantation of incisors in monkeys. *Int. J. Oral Surg.*, Copenhagen, v.10, n.1, p.54-61, 1981b.

ANDREASEN, J.O. Periodontal healing after replantation of traumatically avulsed teeth. Assessment by mobility testing and radiography. *Acta Odontol. Scand.*, Stockholm, v.33, p.325-335, 1975.

ANDREASEN, J.O. A time-related study of periodontal healing and root resorption activity after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Swed. Dent. J.*, Jönköping, v.4, n.3, p.101-110, 1980c.

ANDREASEN, J.O; ANDREASEN, F.M. Avulsões. In:_____. *Texto e atlas colorido de traumatismo dental*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2001. p. 383-425.

ANDREASEN, J.O.; ANDREASEN, F.M. Dental trauma. In: Pine, CM. *Community oral health*. London:Wright, 2002. p.94-99.

ANDREASEN, J.O; HJÖRTING-HANSEN, E. Replantation of teeth. II. Histological study of 22 replanted anterior teeth in humans. *Acta Odontol. Scand.*, Stockholm, v.24, n.3, p.287-306, 1966.

- ANDREASEN, J.O; KRISTERSON, L. The effect of limited drying or removal of periodontal ligament. Periodontal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. Acta Odontol. Scand., Stockholm, v.39, n.1, p.1-13, 1981.
- ANDREASEN, J.O. et al. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 1. Diagnosis of healing complications. Endod. Dent. Traumatol., Copenhagen, v.11, n.2, p.51-58, 1995a.
- ANDREASEN, J.O. et al. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 4. Factors related to periodontal ligament healing. Endod. Dent. Traumatol., Copenhagen, v.11, n. 2, p.76-89, 1995b.
- ANITUA, E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of futures sites for implants. Int. J. Oral Maxillofac. Implants, Lombard, v.14, n.4, p.529-535, 1999.
- ANNUNZIATA, M. et al. *In vitro* cell-type specific biological response of human periodontally related cells to platelet-rich plasma. J. Periodontal Res., Copenhagen, v.40, n.6, p.489-495, 2005.
- ASOU, Y. et al. Osteopontin facilitates angiogenesis, accumulation of osteoclasts, and resorption in ectopic bone. Endocrinology, Springfield, v.142, n.3, p.1325-1332, 2001.
- AYRES, M; AYRES JUNIOR, M. BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 2007. 364 p.
- BARRET, E.J.; KENNY, D.J. Avulsed permanent teeth: a review of the literature and treatment guidelines. Endod. Dent. Traumatol., Copenhagen, v.13, n. 4, p.153-163, 1997.

- BARRET, E.J et al. Replantation of permanent incisors in children using Endogaim. Dent. Traumatol., Copenhagen, v.21, n.5, p. 269-275, 2005.
- BAR-SHAVIT, R.; KHAN, A.; FENTON, J.W. Chemotactic response of monocytes to thrombin. J. Cell. Biol., Nova York, v. 96, n.1, p.282-285, 1983.
- BARTOLD, P.M. et al. Principles and applications of cell delivery systems for periodontal regeneration. Periodontol. 2000, Copenhagen, v.41, p.123-135, 2006.
- BERK, B.C. et al. Thrombin-stimulated events in cultured vascular smooth-muscle cells. Biochem. J. , Londres, v.274, p.799-805, 1991.
- BERNE, R.M.; LEVY, M.N. O sistema cardiovascular. In: _____. Fisiologia. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 303-308.
- BIANCO, P.; ROBEY, P.G. Stem cells in tissue engineering. Nature, Londres, v.414, n.6859, p.118-121, 2001.
- BLOM, S.; HOLMSTRUP, P.; DABELSTEEN, E. The effect of insulin-like growth factor-I and human growth hormone on periodontal ligament fibroblast morphology, growth pattern, DNA synthesis, and receptor binding. J. Periodontol., Chicago, v.63, n. 12, p.960-968, 1992.
- BLOMLÖF, L. et al. Periodontal healing of replanted monkey teeth prevented from drying. Acta Odontol. Scand., Stockholm, v.41, n.2, p.117-123, 1983.
- BLOMLÖF, L. et al. Vitality of periodontal ligament cells after storage of monkey teeth in milk or saliva. Scand. J. Dent. Res., Copenhagen, v.88, n.5, p.441-445, 1980.
- BOER, F.A. et al. Immediate reimplantation of primary teeth: a histological study in dogs. Dent. Traumatol., Copenhagen, v.24, n.3, p.337-342, 2008.

BRADLEY, J.E.; RAMIREZ, G.; HAGOOD, J.S. Roles and regulation of Thy-1, a context-dependent modulator of cell phenotype. *Biofactors*, Oxford, v.35, n.3, p.258-265, 2009.

BUTCHER, E.O., VIDAIR, R.V. Periodontal fiber reattachment in replanted incisors of the monkey. *J. Dent. Res.*, Chicago, v.34, n.4, p.569-576, 1955.

BUTLER, W.T. The nature and significance of osteopontin. *Connect. Tissue Res.*, Londres, v.23, n.2-3, p.123-136, 1989.

CARLSON, N.E.; ROACH JUNIOR, R.B. Platelet-rich plasma. Clinical applications in dentistry. *J. Am. Dent. Assoc.*, Chicago, v.133, n. 10, p.1383-1386, 2002.

CASTELLI, W.A. et al. Vascular response of the periodontal membrane after replantation of teeth. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, St. Louis, v.50, n.5, p.390-397, 1980.

CHAGAS, S.A.; OLIVEIRA, S.; DE BORTOLI JÚNIOR, N. Regeneração tecidual – plasma rico em plaquetas (PRP) e plasma rico em fibrinogênio (PRF). In: PONTUAL, M.A.B.; MAGINI, R.S. Plasma rico em plaquetas (PRP) e fatores de crescimento: das pesquisas científicas à clínica odontológica. São Paulo: Santos, 2004. p.147-162.

CHAN, C.P. et al. Effects of thrombin on the growth, protein synthesis, attachment, clustering and alkaline phosphatase activity of cultured human periodontal ligament fibroblasts. *Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China B, Taiwan*, v.22, n.4, p.137-143, 1998.

- CHEN, L.B.; BUCHANAN, J.M. Mitogenic activity of blood components. I. Thrombin and prothrombin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, Washington, v.72, n.1, p.131-135, 1975.
- CHEN, H. et al. The effect of intracanal anti-inflammatory medicaments on external root resorption of replanted dog teeth after extended extra-oral dry time. Dent. Traumatol., Copenhagen, v. 24, n.1, p.74-78, 2008.
- COCCIA, C.T. A clinical investigation of root resorption rates in reimplanted young permanent incisors: a five-year study. J. Endod., Nova Yorque, v.6, n.1, p.413-420, 1980.
- CONSOLARO, A.; TAVEIRA, L.A.A.; MARTINS-ORTIZ, M.F. Reabsorção dentária por substituição: consequência natural da anquilose alveolodentária. In: CONSOLARO, A. Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas. Maringá: Dental Press, 2005. p. 247-277.
- COPLAND, I. et al. CD34 expression on murine marrow-derived mesenchymal stromal cells: impact on neovascularization. Exp. Hematol., Copenhagen, v. 36, n.1, p. 93-103, 2008.
- CSAKI, C. et al.. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. Histochem. Cell. Biol., Berlin, v.128, n.6 p.507-520, 2007.
- CUNHA, R.F. et al. Pulpal and periodontal reactions of immature permanent teeth in the dog to intrusive trauma. Endod. Dent. Traumatol., Copenhagen, v.11, n.2, p.100-104, 1995.

DAWES, K.E.; GRAY, A.J.; LAURENT, G.J. Thrombin stimulates fibroblast chemotaxis and replication. *Eur. J. Cell. Biol.*, Stuttgart, v. 61, n. 1, p. 126-130, 1993.

DE KOK, I.J. et al. Evaluation of mesenchymal stem cells following implantation in alveolar sockets: a canine safety study. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, Lombard, v.20, n.4, p.511-518, 2005.

DELORME, B.; CHARBORD, P. Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Methods Mol. Med.*, Totowa, v.140, p.67-81, 2007.

DELWICHE, F. et al. Platelet-derived growth factor enhances in vitro erythropoieses via stimulation of mesenchymal cells. *J. Clin. Invest.*, New Haven, v.76, n.1, p.137-142, 1985.

DEMIR, B. et al. Intentional replantation of a hopeless tooth with the combination of platelet rich plasma, bioactive glass graft material and non-resorbable membrane: a case report. *Dent. Traumatol.*, Copenhagen, v.23, n.3, p.190-194, 2007.

DENHARDT, D.T.; GUO, X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J.*, Bethesda, v.7, n.15, p.1475-1482, 1993.

DEUEL, T.F.; HUANG, J.S. Platelet-derived growth factor: Structure, function, and roles in normal and transformed cells. *J. Clin. Invest.*, New Haven, v.74, n.3, p.669-676, 1984.

DOHAN, D.M. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, St. Louis, v.101, n.3, p.e37-44, 2006.

DURR, D.P; SVEEN, O.B. Pulpal responses after the avulsion and replantation of permanent teeth. *J. Pedod.*, Birmingham, v.11, n.4, p.301-310, 1987.

DVORAK, H.F. et al. Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab. Invest.*, Nova Yorque, v.57, n.6, p. 673-686, 1987.

DVORAKOVA, J. et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell population entrapped in bone marrow collection sets. *Cell Biol. Int.*, Londres, v.32, n.9, p.1116-1125, 2008.

ESTRELA, C. Eficácia antimicrobiana de pastas de hidróxido de cálcio. Ribeirão Preto. 1997. 142 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1997.

EVERTS, P.A.M et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J. Extra Corpor. Technol.*, St. Paul, v.38, n.2, p.174-187, 2006.

FENTON, J.W. Regulation of thrombin generation and functions. *Semin. Thromb. Hemost.*, Nova Yorque, v.14, n.3, p.234-240, 1988.

FILHO CERRUTI, H. et al. Allogeneous bone grafts improved by bone marrow stem cells and platelet growth factors: clinical case reports. *Artif. Organs*, Cleveland, v.31, n.4, p.268-273, 2007.

FLORYAN, K.M.; BERGHOFF, W.J. Intraoperative use of autologous platelet-rich and platelet-poor plasma for orthopedic surgery patients. *AORN J.*, Nova Yorque, v. 80, n.4, p.668-674, 2004.

GABRIELLI, M.F.R. et al. The effect of splinting upon healing after tooth replantation: a histological study in rat molars. *J. Nihon Univ. Sch. Dent.*, Tokyo, v.26, n.1, p.59-71, 1984.

GIANNOBILE, W.V. Periodontal tissue engineering by growth factors. *Bone*, Nova Yorque, v.19, supl. 1, p. 23S-37S, 1996.

- GILLMAN, T. Tissue regeneration. In: BOURNE, G.H. Structural aspects of ageing. London: Pitman, 1961. p. 144-176.
- GONSHOR, A. Technique for producing platelet rich plasma and platelet concentrate. Int. J. Periodontics Restorative Dent., Chicago, v.22, n.6, p.547-557, 2002.
- GOTTRUP, F.; ANDREASEN, J.O. Cicatrização da lesão após trauma. In: Andreasen J.O.; Andreasen F.M. Texto e atlas colorido de traumatismo dental. Porto Alegre: Artmed, 2001. p. 13-76.
- GRONTHOS, S. et al. Bone marrow stromal stem cells for tissue engineering. Periodontol. 2000, Copenhagen, v.41, p.188-195, 2006.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Hemostasia e coagulação sanguínea. In: _____, Tratado de fisiologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.394-404.
- HAMMARSTRÖM, L.; BLOMÖF, L.; LINDSKOG, S. Dynamics of dentoalveolar ankylosis and associated root resorption. Endod. Dent. Traumatol., Copenhagen, v.5, n.4, p.163-175, 1989.
- HAMMARSTRÖM, L. et al. Replantation of teeth and antibiotic treatment. Endod. Dent. Traumatol., Copenhagen, v.2, n. 2, p.51-57, 1986.
- HAN, J. et al. The effect of different platelet-rich plasma concentrations on proliferation and differentiation of human periodontal ligaments cells *in vitro*. Cell Prolif., Oxford, v.40, n.2, p.241-252, 2007.
- HARCHER, L.A.; FINCH, C.A. Thrombokinetics in man. J. Clin. Invest., New Haven, v.48, n.6, p. 963-974, 1969.

- HASEGAWA, N. et al. Behavior of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects. *J. Periodontol.*, Chicago, v. 77, n.6, p.1003-1007, 2006.
- HERBERT, J.M. et al. Thrombin induces endothelial cell growth via both a proteolytic and non-proteolytic pathway. *Biochem J.*, Londres, v.303 pt.1, p. 227-231, 1994.
- HOLLAND, R. et al. Influence of the type of vehicle and limit of obturation on apical and periapical tissue response in dogs teeth after root canal filling mineral trioxide aggregate. *J. Endod.*, Chicago, v.33, n.6, p.693-697, 2007.
- HORI, Y. et al. Effect of culture substrates and fibroblast growth factor addition in the proliferation and differentiation of rat bone marrow stromal cells. *Tissue Eng.*, Nova York, v.10, n.7-8, p.995-1005, 2004.
- HOTZ, G. Alveolar ridge augmentation with hydroxylapatite using fibrin sealant for fixation. Part I: An experimental study. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, Copenhagen, v.20, n.4, p.204-207, 1991.
- HUGHES, F.J. et al. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontol. 2000*, Copenhagen, v.41, p.48-72, 2006.
- IGBAL, M.K.; BAMAAS, N. Effect of enamel matrix derivative (EMDOGAIN) upon periodontal healing after replantation of permanent incisors in beagle dogs. *Dent. Traumatol.*, Copenhagen, v.17, n.1, p.36-45, 2001.
- ITO, K. et al. Simultaneous implant placement and bone regeneration around dental implants using tissue-engineered bone with fibrin glue, mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. *Clin. Oral Implants Res.*, Copenhagen, v.17, n.5, p.579-586, 2006.

- JAMES, K. et al. Small challenges in polymer chemistry have large effect on the bone-implant interface: evaluation of a series of degradable tyrosine-derived polycarbonates in bone defects. *Biomaterials*, Guilford, v.20, n.23-24, p.2203-2212, 1999.
- KAARTINEN, M.T. et al. Cross-linking of osteopontin by tissue transglutaminase increases its collagen binding properties. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v.274, n.3, p.1729-1735, 1999.
- KAIGLER, D.; MOONEY, D. Tissue engineering's impact on dentistry. *J. Dent. Educ.*, Washington, v.65, n.5, p.456-462, 2001.
- KARRING, T. et al. Development of the biological concept of guided-tissue regeneration-- animal and human studies. *Periodontol.* 2000, Copenhagen, v.1, n.1, p. 26-35, 1993.
- KNIGHTON, D.R.; HUNT, T.K.; THAKRAL, K.K.; GOODSON, W.H. 3rd . Role of platelets and fibrin and the healing sequence: an in vivo study of angiogenesis and collagen synthesis. *Ann. Surg.*, Philadelphia, v.196, n.4, p.379-388, 1982.
- KON, E. et al. Platelet rich plasma: new clinical application: a pilot study for treatment of jumper's knee. *Injury*, Amsterdam, v.40, n.6, p.598-603, 2009.
- KRISTERSON, L.; ANDREASEN, J.O. Influence of root development on periodontal and pulpal healing after reimplantation of incisors in monkeys. *Int. J. Oral Surg.*, Copenhagen, v.13, n.4, p.313-323, 1984.
- LANDESBURG, R.; MOSES, M.; KARPATKIN, M. Risks of using platelet rich plasma gel. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, Philadelphia, v.56, n.9, p.1116-1117, 1998.

LAO, M.; MARINO, V.; BARTOLD, P.M. Immunohistochemical study of bone sialoprotein and osteopontin in healthy and diseased root surface. *J. Periodontol.*, Chicago, v.77, n.10, p.1665-1673, 2006.

LAWRENCE, W.T. et al. The reversal of an adriamycin induced healing impairment with chemoattractants and growth factor. *Ann. Surg.*, Philadelphia, v.203, n.2, p.142-147, 1986.

LEÃO, M.P. Formação *in vitro* da rede de fibrina durante a ativação do plasma rico em plaquetas com cloreto de cálcio a 10% em temperatura de 37°C. 2002. 123 f. Dissertação (Mestrado em Implantodontia)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

LEÃO, M.P.; MAGINI, R.S. Coagulação (Formação de gel): trombina + cloreto de cloreto de cálcio. In: PONTUAL, M.A.B.; MAGINI, R.S. Plasma rico em plaquetas (PRP) e fatores de crescimento: das pesquisas científicas à clínica odontológica. São Paulo: Santos, 2004. p.233-257.

LEKOVIC, V. et al. Comparison of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral, and guided tissue regeneration versus platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: a reentry study. *J. Periodontol.*, Chicago, v.73, n.2, p.198-205, 2002.

LEMOLI, R.M. et al. Stem cell plasticity: time for a reappraisal? *Haematologica*, Pavia, v.90, n.3, p. 360-381, 2005.

LENHARO, A., MENDONÇA, R.G. Plasma rico em plaquetas. In: BEZERRA, F.J.B.; LENHARO, A. Terapia clínica avançada em implantodontia. São Paulo: Artes Médicas, 2002. p.77-104.

- LENHARO, A. et al. Plasma rico em plaquetas- PRP. In: PONTUAL, M.A.B.; MAGINI, R.S. Plasma rico em plaquetas (PRP) e fatores de crescimento: das pesquisas científicas à clínica odontológica. São Paulo: Santos, 2004. p.165-185.
- LI, W.J. et al. A three dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, Guilford, v.26, n.25,p.599-609, 2005.
- LIN, S.S.; LANDESBURG, R.; CHIN, H.S.; LIN, J.; EISIG, S.B.; LU, H.H. Controlled release of PRP-derived growth factors promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, Piscataway, v.1, p.4358-4361, 2006.
- LINDEBOOM, J.A.H. et al. Influence of the application of platelet-enriched plasma in oral mucosa wound healing. *Clin. Oral Implants Res.*, Copenhagen, v.18, n.1, p.133-139, 2007.
- LINDSKOG, S. et al. Repair of periodontal tissues in vivo and in vitro. *J. Clin. Periodontol.*, Copenhagen, v.10, n.2, p.188-205, 1983.
- LINDSKOG, S.; PIERCE, A.; BLOMLÖF, L.; HAMMARSTRÖM, L. The role of the necrotic periodontal membrane in cementum resorption and ankylosis. *Endod. Dent. Traumatol.*, Copenhagen, v. 1, n.3, p.96-101, 1985.
- LIU, Y. et al. Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate in vitro is pH dependent. *Wound Repair Regen.*, St. Louis, v. 10, n.5, p.336-340, 2002.
- LYNCH, S.E. et al. Comparative effects of growth factors on soft tissue repair. *J. Dent. Res.*, Chicago, v.68, spec. iss., p.326, 1989a. (Abstract 1153).

LYNCH, S.E. et al. A combination of platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor enhances periodontal regeneration. *J. Clin. Periodontol.*, Copenhagen, v. 16, n.8, p.545-548, 1989b.

LYNCH, S.E. et al. The effect of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J. Periodontol.*, Chicago, v.62, n.7, p.458-467, 1991.

LUCARELLI, E. et al. Platelet-derived growth factor enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials*, Guilford, v.24, n.18, p.3095-3100, 2003.

MACEDO, A.P. Protocolo de obtenção e aplicações clínicas do PRP. In: PONTUAL, M.A.B.; MAGINI, R.S. Plasma rico em plaquetas (PRP) e fatores de crescimento: das pesquisas científicas à clínica odontológica. São Paulo: Santos, 2004. p.189-230.

MAO, J.J. et al. Craniofacial tissue engineering by stem cells. *J. Dent. Res.*, Chicago, v.85, n.11, p. 966-979, 2006.

MARX, R.E. Platelet-rich plasma: a source of multiple autologous growth factor for bone grafts. In: LYNCH, S.E.; GENCO, R.J.; MARX, R.E. *Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics*. Chicago: Quintessence, 1999. p. 71-82.

MARX, R.E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, Philadelphia, v.62, n.4, p.489-496, 2004.

MARX, R.E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant. Dent.*, Baltimore, v.10, n.4, p. 225-228, 2001.

MARX, R.E. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, Philadelphia, v.58, n.3, p.300-301, 2000.

MARX, R.E. et al. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, St. Louis, v.85, n.6, p.638-646, 1998.

MARZOLA, C.; CAMPANELLA JUNIOR, E. Reimplante em dentes com a raiz em formação. *RGO*, Porto Alegre, v.31, n.1, p.15-18, 1983.

MATSSON, L. et al. Ankylosis of experimentally reimplanted teeth related to extra-alveolar period and storage environment. *Pediatr. Dent.*, Chicago, v.4, n.4, p. 327-329, 1982.

MESSORA, M.R. Influência do plasma rico em plaquetas no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico em calvárias de ratos: estudo histológico e histométrico. 2005. 144 f. Dissertação (Mestrado em Periodontia), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, 2005.

MESSORA, M.R. et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria. *J. Periodontol. Res.*, Copenhagen, v.43, n.2, p.217-223, 2008.

MIMURA, T. et al. A novel exogenous concentration-gradient collagen scaffold augments full-thickness articular cartilage repair. *Osteoarthritis Cartilage*, Londres, v.16, n.9, p.1083-1091, 2008.

MINKIN, C. Bone-acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif. Tissue Int.*, Berlin, v.34, n.3, p.285-290, 1982.

MOIOLI, E.K. et al. Matrices and scaffolds for drug delivery in dental, oral and craniofacial tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Amsterdam, v.59, n.4-5, p.308-324, 2007.

MONTGOMERY, E.H. Antibióticos bacterianos. In: YAGIELA, J.A.; NEIDLE, E.A.; DOWD, F.J. *Farmacologia e terapêutica para dentistas*. 4. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.468-502.

MORGADO, M.L.C.; SAGRETTI, O.M.A.; GUEDES PINTO, A.C. Reimplantes dentários. *Rev. Bras. Odontol.*, Rio de Janeiro, v.49, n.3, p.38-44, 1992.

MORO, M.A. Resposta tecidual a reimplantes de dentes de cães tratados endodonticamente com hidróxido de cálcio, hidróxido de cálcio com calcitocina, Sealapex e Endofil. 2004. 321 f. Tese (Doutorado em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial)-Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2004.

MORSE, A. Formic acid sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bones for sectioning in paraffin. *J. Dent. Res.*, Chicago, v.24, n.3-4, p.143-153, 1945.

MURAD, R. Estudo microscópico sobre a influência da raspagem da membrana periodontal e/ou remoção da polpa e obturação de canal com hidróxido de cálcio em reimplantes dentais em cães. 1982. 41 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 1982.

NAGAE, M. et al. Intervertebral disc regeneration using platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel microspheres. *Tissue Eng.*, Nova Yorque, v.13, n.1, p.147-158, 2007.

NAKAHARA, T. et al. *In situ* tissue engineering of periodontal tissues by seeding with periodontal ligament-derived cells. *Tissue Eng.*, Nova Yorque, v.10, n.3-4, p.537-544, 2004.

NAKAHARA, T. et al. Novel approach to regeneration of periodontal tissues based on *in situ* tissue engineering: effects of controlled release of basic fibroblast growth factor from a sandwich membrane. *Tissue Eng.*, Nova Yorque, v.9, n.1, p.153-162, 2003.

NASJLETI, C.E. et al. The effects of different splinting times on replantation of teeth in monkeys. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, St. Louis, v.53, n.6, p.557-566, 1982.

NASJLETI, C.E. et al. Effect of citric acid and lyophilized autologous plasma on healing following periodontal flap surgery in monkeys. *J. Periodontol.*, Chicago, v.58, n.11, p.770-779, 1987b.

NASJLETI, C.E. et al. Effect of fibronectin on healing of replanted teeth in monkeys: a histologic and autoradiographic study. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, St. Louis, v.63, n.3, p.291-299, 1987a.

NASJLETI, C.E. et al. Effect of lyophilized autologous plasma on periodontal healing of replanted teeth. *J. Periodontol.*, Chicago, v.57, n.9, p.568-578, 1986.

NASJLETI, C.E. et al. Healing after tooth reimplantation in monkeys. A radioautographic study. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, St. Louis, v.39, n.3, p.361-375, 1975.

NEVINS, A.J. et al. Replantation of enzymatically treated teeth in monkeys. Part I. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, St. Louis, v. 50, n.3, p.277-281, 1980.

NORDENRAM, A.; BANG, G.; ANNEROTH, G. A histopathologic study of replanted teeth with superficially demineralized root surfaces in Java monkeys. *Scand. J. Dent. Res.*, Copenhagen, v.81, n.4, p. 294-302, 1973.

OIKARINEN, K. Dental tissues involved in exarticulation, root resorption and factors influencing prognosis in relation to replanted teeth. A review. *Proc. Finn. Dent. Soc.*, Helsinki, v.89, n.1-2, p.29-44, 1993.

OIKARINEN, K.S.; STOLTZE, K.; ANDREASEN, J.O. Influence of conventional forceps extraction and extraction with an extrusion instrument on cementoblast loss and external root resorption of replanted monkey incisors. *J. Periodontal. Res.*, Copenhagen, v.31, n.5, p.337-344, 1996.

OKUDA, K. et al. Platelet-rich plasma combined with a porous hydroxyapatite graft for the treatment of intrabony periodontal defects in humans: a comparative controlled clinical study. *J. Periodontol.*, Chicago, v.76, n.6, p.890-898, 2005.

OKUDA, K. et al. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J. Periodontol.*, Chicago, v.74, n.6, p.849-857, 2003.

- OLIVA, A. et al. Ex vivo expansion of bone marrow stromal cells by platelet-rich plasma: a promising strategy in maxillo-facial surgery. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, Silvi Marina, v.18, supl.3,p.47-53, 2005.
- OLIVEIRA, G.K. Células-tronco mononucleares autólogas na cicatrização de defeitos tibiais agudos experimentais de cão. 2008. 50 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.
- OOSTA, G.M. et al. Purification and properties of human platelet heparitinase. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v.257, n.19, p.11249-11255, 1982.
- PANZARINI, S.R.; PERRI DE CARVALHO, A.C.; POI, W.R.; SONODA, C.K. Use of Vitamin C in delayed tooth replantation. *Braz. Dent. J.*, Ribeirão Preto, v.16, n.1, p.17-22, 2005.
- PEARSON, B.S. et al. Comments on the clinical application of fibronectin in dentistry. *J. Dent. Res.*, Chicago, v.67, n.2, p. 515-517, 1988.
- PITTINGER, M.F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, Washington, v. 284, n.5411, p.143-147, 1999.
- PITT FORD, T.R. Tissue reactions to two root canal sealers containing formaldehyde. *Oral Surg, Oral Med., Oral Pathol.*, St. Louis, v.60, n.6, p.661-665, 1985.
- POLSON, A.M.; PROYE, M.P. Fibrin linkage: a precursor for new attachment. *J. Periodontol.*, Chicago, v.54, n.3, p.141-147, 1983.
- PONTIKOGLOU, C.; DELORME, B.; CHARBORD, P. Human bone marrow native mesenchymal stem cells. *Regen. Med.*, Londres, v.3, n.5, p.731-741, 2008.

- POTIER, E.; PETITE, H. Utilisation thérapeutique des cellules souches en orthopédie. **Pathol. Biol.**, Paris, v. 53, n.3, p. 142-148, 2005.
- RIPAMONTI, U.; PETIT, J.C. Patterns of healing on replanted baboon incisors coated with and allogeneic fibrin-fibronectin. *J. Periodontal. Res.*, Copehagen, v.24, n.5, p.335-342, 1989.
- RISBUD, M.V.; SHAPIRO, I.M. Stem cells in craniofacial and dental tissue engineering. *Orthod. Craniofac. Res.*, Oxford, v.8, n.2, p.54-59, 2005.
- ROBEY, P.G. et al. Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type beta (TGF-beta) in vitro. *J. Cell. Biol.*, Nova Yorque, v. 105, n.1, p.457-463, 1987.
- RUSSO, M.C.; HOLLAND, R. Microscopical findings after protection with various dressings in pulpotomized teeth of dogs. *Rev. Fac. Odontol. Araçatuba*, Araçatuba, v.3, n.1, p.113-123, 1974.
- SAE-LIM, V.; METZGER, Z.; TROPE, M. Local dexamethasone improves periodontal healing of replanted dog´s teeth. *Endod. Dent. Traumatol.*, Copenhagen, v.14, n. 5, p. 232-236, 1998.
- SAHARA, N. et al. Cytodifferentiation of the odontoclast prior to the shedding of human deciduous teeth: an ultrastructural and cytochemical study. *Anat. Rec.*, Nova Yorque, v. 244, n.1, p.33-49, 1996.
- SALTZ, R. et al. Experimental and clinical applications of fibrin glue. *Plast. Reconstr. Surg.*, Baltimore, v.88, n.6, p.1005-1015, 1991.

- SAMMARTINO, G. et al. Use of autologous platelet-rich plasma (PRP) in periodontal defect treatment after extraction of impacted mandibular third molars. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, Philadelphia, v.63, n.6, p.766-770, 2005.
- SANTOS, M.D.; SANTOS, M.D.D. O sangue e a medula. In: PONTUAL, M.A.B.; MAGINI, R.S. Plasma rico em plaquetas (PRP) e fatores de crescimento: das pesquisas científicas à clínica odontológica. São Paulo: Santos, 2004. p.3-44.
- SHELLER, E.L.S.; KREBSBACH, P.H.; KOHN, D.H. Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation. *J. Oral Rehabil.*, Oxford, v.36, n.5, p.368-389, 2009.
- SCHNABEL, L.V. et al. Effects of platelet rich plasma and acellular bone marrow on gene expression patterns and DNA content of equine suspensory ligament explants cultures. *Equine Vet. J.*, Londres, v.40, n.3, p.260-265, 2008.
- SEGURA-CASTILLO, J.L. et al. Reduction of bone resorption by the application of fibrin glue in the construction of alveolar cleft. *J. Craniofac. Surg.*, Burlington, v.16, n.1, p.105-112, 2005.
- SEKIYA, I. et al. Comparison of effect of BMP-2, -4, -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res.*, Nova York, v.320, n.2, p.269-276, 2005.
- SHASHIKIRAN, N.D. et al. Applications of platelet-rich plasma (PRP) in contemporary pediatric dentistry. *J. Clin. Pediatr. Dent.*, Chicago, v.30, n.4, p.283-286, 2006.
- SHULMAN, L.B.; GEDALIA, I.; FEINGOLD, R.M. Fluoride concentration in root surfaces and alveolar bone of fluoride-immersed monkey incisors three weeks after replantation. *J. Dent. Res.*, Chicago, v.52, n.6, p.1314-1316, 1973.

- SILVER, F.H.; WANG, M.C.; PINS, G.D. Preparation and use of fibrin glue in surgery. *Biomaterials*, Guilford, v.16, n.12, p. 891-903, 1995.
- SLAVKIN, H.C.; BARTOLD, P.M. Challenges and potential in tissue engineering. *Periodontol. 2000*, Copenhagen, v.41, p.9-15, 2006.
- SÖDER, P.O. et al. Effect of drying on viability of periodontal membrane. *Scand. J. Dent. Res.*, Copenhagen, v.85, n.3, p.164-168, 1977.
- SOFFER, E.; OUHAYOUN, J.P.; ANAGNOSTOU, F. Fibrin sealants and platelets preparations in bone and periodontal healing. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, St. Louis, v.95, n.5, p.521-528, 2003.
- SONNLEITNER, D.; HUEMER, P.; SULLIVAN, D.Y. A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques: a technical note. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, Lombard, v.15, n.6, p.879-882, 2000.
- SONODA, C.K. Reimplante mediato de dentes com a superfície radicular tratada com solução de hipoclorito de sódio a 2% e solução de fluoreto de sódio a 2%. Estudo histomorfológico em cães. 1997. 109 f. Tese (Doutorado em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 1997.
- SOTTOVIA, A.D. Reimplante dentário após a utilização da solução de Euro-Collins® ou leite bovino como meio de conservação: análise histomorfométrica em cães. Araçatuba, 2007. 91 f. Tese (Doutorado em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial)- Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2007.

STASZYK, C.; GASSE, H. Primary culture of fibroblasts and cementoblasts of the equine periodontium. *Res. Vet. Sci.*, Oxford, v.82, n.2, p.150-157, 2007.

STEENFOS, H.H.; LOSSING, C.; HANSSON, H.A. Immunohistochemical demonstration of endogenous growth factors in wound healings. *Wounds*, Malvern, v.2, n. 6, p.218-226,1990.

STRAUER, B.E. et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*, Dallas, v.106, n.15, p.1913-1918, 2002.

TERRANOVA, V.P.; WIKESJÖ, U.M. Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells of the periodontium. A review. *J. Periodontol.*, Chicago, v. 58, n. 6, p.371-380, 1987.

THESLEFF, I.; SHARPE, P. Signaling networks regulating dental development. *Mech. Dev.*, Shannon, v.67, n.2, p.111-123, 1997.

TOBITA, M.C. et al. Periodontal tissue regeneration with adipose-derived stem cells. *Tissue Eng.*, Nova York, v. 14, n.6, p. 945-953, 2008.

TÖZÜM, T.F.; DEMIRALP, B. Platelet-rich plasma: a promising innovation in dentistry. *J. Can. Dent. Assoc.*, Ottawa, v.69, n.10, p.664, 2003.

TÖZÜM, T.F. et al. Intentional replantation for a periodontally involved hopeless incisor by using autologous platelet-rich plasma. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, St. Louis, v.101, n.6, p.e119-e124, 2006.

TRONSTAD, L. Root resorption – etiology, terminology, and clinical manifestations. *Endod. Dent. Traumatol.*, Copenhagen, v.4, n.6, p.241-252, 1988.

TRONSTAD, L.; KRESHTOOL, D.; BARNETT, F. Microbiological monitoring and results of treatment of extrarradicular endodontic infection. *Endod. Dent. Traumatol.*, Copenhagen, v.6, n.3, p.129-136, 1990.

TROPE, M.; FRIEDMAN, S. Periodontal healing of replanted dog teeth in Viaspan, milk and Hank's balanced salt solution. *Endod. Dent. Traumatol.*, Copenhagen, v.8, n. 5, p.183-188, 1992.

TSAY, R.C. et al. Differential growth factor retention by platelet-rich plasma composites. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, Philadelphia, v.63, n.4, p.521-528, 2005.

VAN DEN DOLDER, J. et al. Platelet-rich plasma: quantification of growth factor levels and the effect on growth and differentiation of rat bone marrow cells. *Tissue Eng.*, Nova Yorque, v.12, n.11, p.3067-3073, 2006.

WAHL, L.M.; WAHL, S.M. Inflammation. In: COHEN, I.K.; DIEGELMANN, R.F.; LINDBLAD, W.J. (Ed.) *Wound healing: biochemical and clinical aspects*. Philadelphia: WB Saunders, 1992. p. 40-62.

WEIBRICH, G.; KLEIS, W.K. Curasan PRP kit vs PCCS PRP system. Collection efficiency and platelet counts of two different methods for the preparation of platelet-rich plasma. *Clin. Oral Implants Res.*, Copenhagen, v.13, n.4, p.437-443, 2002.

WEKSLER, B.B.; LEY, C.W.; JAFFE, E.A. Stimulation of endothelial cell prostacycline production by thrombin, trypsin and ionosphere A23187. *J. Clin. Invest.*, New Haven, v.62, n.5, p.923-930, 1978.

WHITMAN, D.H.; BERRY, R.L.; GREEN, D.M. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, Philadelphia, v.55, n.11, p.1294-1299, 1997.

WIKESJÖ, U.M.E.; CLAFFEY, N.; EGELBERG, J. Periodontal repair in dogs. Effect of heparin treatment of the root surface. *J. Clin. Periodontol.*, Copenhagen, v. 18, n.1, p.60-64, 1991.

WILTFANG, J. et al. Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical size defects. An animal experiment. *Clin. Oral Implants Res.*, Copenhagen, v.15, n.2, p.187-193, 2004.

YAMADA, Y. et al. A novel approach to periodontal tissue regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma using tissue engineering technology: a clinical case report. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.*, Chicago, v.26, n.4, p.363-369, 2006.

YAMADA, Y. et al. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clin. Oral Implants Res.*, Copenhagen, v.15, n.5, p.589-597, 2004.

ZANETTA-BARBOSA, D.; CARVALHO, A.C.D. Effect of brief storage in ATP solution on periodontal healing after replantation of teeth in rats. *Endod. Dent. Traumatol.*, Copenhagen, v.6, n.5, p.193-199, 1990.

Anexo A

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
Campus de Araçatuba

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "EFEITO DAS CÉLULAS-TRONCO ORIGINÁRIAS DA MEDULA ÓSSEA E DO LIGAMENTO PERIODONTAL NA REGENERAÇÃO DO LIGAMENTO PERIODONTAL APÓS REIMPLANTE DENTÁRIO: ESTUDO EM CÃES" sob responsabilidade de CÉLIO PERCINOTO, LUCIANA REICHERT DA SILVA ASSUNÇÃO, SANDRA HELENA PENHA DE OLIVEIRA, SÍLVIO EDUARDO DUAILIBI e MÔNICA DUAILIBI está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado *AD REFERENDUM* pela CEEA em 07 de julho de 2006, de acordo com o protocolo nº 57/06.

Araçatuba, 07 de julho de 2006.


Prof.ª Ass. Dr.ª Maria Gisela Laranjeira
Presidente

Medidas da área dentária total e das áreas comprometidas por reabsorção de superfície, por substituição e inflamatória no grupo controle (Ct)

Corte	Grupo	Área total A.T.	Superfície Reab. Sup.		Substituição Reab. Subs.		Inflamatória Reab. Infl.		A.T. Reabsorção	
			V. Absol.	V. Relat. (%)	V. Absol.	V. Relat. (%)	V. Absol.	V. Relat. (%)	V. Absol.	V. Relat. (%)
1	Ct	133811,125	1602,000	1,2	21361,539	16,0	0	0,0	22963,539	17,1
2	Ct	74307,781	0	0,0	0	0,0	15193,198	20,4	15193,198	20,4
3	Ct	269359,438	5211,233	2,0	0	0,0	0	0,0	5211,233	2,0
4	Ct	189072,578	430,500	0,2	0	0,0	0	0,0	430,500	0,2
5	Ct	83817,461	1510,116	1,8	0	0,0	0	0,0	1510,116	1,8
6	Ct	96171,113	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
7	Ct	221345,219	3940,616	1,8	0	0,0	0	0,0	3940,616	1,8
8	Ct	123516,496	692,116	0,6	9819,879	8,0	0	0,0	10511,995	8,5
9	Ct	184661,797	4021,233	2,2	0	0,0	0	0,0	4021,233	2,2
10	Ct	136173,172	0	0,0	36214,792	26,6	0	0,0	36214,792	26,6
11	Ct	121827,512	1930,849	1,6	0	0,0	0	0,0	1930,849	1,6
12	Ct	142611,586	0	0,0	1594,616	1,1	11055,781	7,7	12650,397	8,9

Medidas da área dentária total e das áreas comprometidas por reabsorção de superfície, por substituição e inflamatória no grupo Plasma Pobre em Plaquetas (PPP)

Corte	Grupo	Área total A.T.	Superfície Reab. Sup.		Substituição Reab. Subs.		Inflamatória Reab. Infl.		A.T. Reabsorção	
			V. Absol.	V. Relat. (%)	V. Absol.	V. Relat. (%)	V. Absol.	V. Relat. (%)	V. Absol.	V. Relat. (%)
1	PPP	200267,850	4238,349	2,1	0	0,0	0	0	4238,349	2,1
2	PPP	231890,469	501,849	0,2	10434,164	4,5	19336,582	8,3	30272,595	13,0
3	PPP	186367,484	681,849	0,4	9057,892	4,9	19565,582	10,5	29305,323	17,2
4	PPP	170151,781	1984,849	1,2	3703,966	2,2	36909,314	21,7	42598,129	25,0
5	PPP	220962,078	3768,349	1,7	0	0,0	0	0,0	3768,349	1,7
6	PPP	179023,172	1507,831	0,8	0	0,0	0	0,0	1507,831	0,8
7	PPP	274313,156	7131,698	2,6	0	0,0	0	0,0	7131,698	2,6
8	PPP	177199,766	3508,198	2,0	0	0,0	0	0,0	3508,198	2,0
9	PPP	192950,875	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
10	PPP	223786,977	654,233	0,3	0	0,0	0	0,0	654,233	0,3
11	PPP	138361,938	1371,966	1,0	0	0,0	0	0,0	1371,966	1,0
12	PPP	121129,898	780,616	0,6	7664,966	6,3	22693,728	18,7	31139,31	25,7

Medidas do perímetro dentário total e das áreas comprometidas por anquilose no grupo Plasma Pobre em Plaquetas (PPP)

Dente	Grupo	Perímetro total P.T.	Anquilose V. Absol. V. Relat (%)
I ₂ ID (Bl. 28, lam.1)	GrPPP	4036,692	90,050 2,2

Medidas da área dentária total e das áreas comprometidas por reabsorção de superfície, por substituição e inflamatória no grupo Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio (PRP)

Corte	Grupo	Área total A.T.	Superfície Reab. Sup.		Substituição Reab. Subs.		Inflamatória Reab. Infl.		A.T. Reabsorção	
			V. Absol.	V. Relat. (%)	V. Absol.	V. Relat. (%)	V. Absol.	V. Relat. (%)	V. Absol.	V. Relat. (%)
1	PRP	162917,398	2296,116	1,4	1807,500	1,1	0	0,0	4103,616	2,5
2	PRP	121275,164	1389,616	1,1	0	0,0	0	0,0	1389,616	1,1
3	PRP	207205,664	1436,500	0,7	0	0,0	0	0,0	1436,500	0,7
4	PRP	198907,445	1390,180	0,7	0	0,0	0	0,0	1390,180	0,7
5	PRP	137145,125	0	0,0	14991,315	11,0	3044,849	2,2	18036,164	13,1
6	PRP	102680,852	1957,849	2,0	0	0,0	17858,465	17,4	19816,314	19,3
7	PRP	88883,766	823,616	1,0	6402,199	7,2	0	0,0	7225,815	8,1
8	PRP	222266,641	2575,116	1,1	0	0,0	0	0,0	2575,116	1,1
9	PRP	95912,344	728,000	0,7	0	0,0	0	0,0	728,000	0,7
10	PRP	116141,227	0	0,0	6167,616	5,3	0	0,0	6167,616	5,3
11	PRP	210361,938	0	0,0	8359,530	4,0	0	0,0	8359,530	4,0
12	PRP	169700,094	4253,966	2,5	0	0,0	0	0,0	4253,966	2,5

Medidas da área dentária total e das áreas comprometidas por reabsorção de superfície, por substituição e inflamatória no grupo Plasma Rico em Plaquetas ativado por trombina de origem bovina e cloreto de cálcio (PRP+TR)

Sorte	Grupo	Área total A.T.	Superfície Reab. Sup.		Substituição Reab. Subs.		Inflamatória Reab. Infl.		A.T. Reabsorção	
			V. Absol.	V. Relat. (%)	V. Absol.	V. Relat. (%)	V. Absol.	V. Relat. (%)	V. Absol.	V. Relat. (%)
1	PRP + TR	38181,699	1358,000	3,5	0	0,0	0	0,0	1358,000	3,5
2	PRP + TR	61336,000	2344,616	3,8	0	0,0	7039,500	11,5	9384,116	15,3
3	PRP + TR	56681,965	1588,000	2,8	0	0,0	6189,849	11,0	7777,849	13,7
4	PRP + TR	70199,180	788,500	2,8	0	0,0	0	0,0	788,500	2,8
5	PRP + TR	61699,117	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
6	PRP + TR	100313,734	523,000	0,5	0	0,0	2692,500	2,7	3215,500	3,2
7	PRP + TR	96244,734	2979,616	3,0	0	0,0	0	0,0	2979,616	3,0
8	PRP + TR	110775,234	932,116	0,8	0	0,0	0	0,0	932,116	0,8
9	PRP + TR	140567,438	612,616	0,4	0	0,0	0	0,0	612,616	0,4
10	PRP + TR	121261,617	568,500	0,5	0	0,0	0	0,0	568,500	0,5
11	PRP + TR	104094,500	5331,715	5,1	0	0,0	0	0,0	5331,715	5,1
12	PRP + TR	68676,234	1679,000	2,4	0	0,0	0	0,0	1679,000	2,4

Medidas da área dentária total e das áreas comprometidas por reabsorção de superfície, por substituição e inflamatória no grupo células-tronco associadas ao Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio (CT + PRP)

Corte	Grupo	Área total A.T.	Superfície Reab. Sup.		Substituição Reab. Subs.		Inflamatória Reab. Infl.		A.T. Reabsorção	
			V. Absol.	V. Relat. (%)	V. Absol.	V. Relat. (%)	V. Absol.	V. Relat. (%)	V. Absol.	V. Relat. (%)
1	CT + PRP	139584,750	0	0,0	29350,445	21,0	0	0,0	29350,445	21,0
2	CT + PRP	126560,078	389,000	0,3	16684,047	13,2	4014,966	3,2	21088,013	16,7
3	CT + PRP	174154,938	0	0,0	51155,164	29,4	0	0,0	51155,164	29,4
4	CT + PRP	184969,938	789,000	0,4	7517,326	4,0	18786,914	10,1	27093,24	14,6
5	CT + PRP	186325,563	4755,349	2,5	0	0,0	0	0,0	4755,349	2,5
6	CT + PRP	97541,164	2306,349	2,4	0	0,0	0	0,0	2306,349	2,4
7	CT + PRP	131983,762	2803,466	2,1	0	0,0	0	0,0	2803,466	2,1
8	CT + PRP	103248,914	810,233	0,8	0	0,0	0	0,0	810,233	0,8
9	CT + PRP	176852,547	0	0,0	22004,893	12,4	0	0,0	22004,893	12,4
10	CT + PRP	137658,547	426,500	0,3	31129,660	22,6	0	0,0	31556,16	22,9
11	CT + PRP	201236,469	2275,116	1,1	21993,361	11,0	0	0,0	24268,477	12,0
12	CT + PRP	121339,930	0	0,0	14968,432	12,3	8427,913	7,0	23396,345	19,3

Anexo C

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO¹

Engenharia dos Tecidos Periodontais após Reimplante Dentário. Estudo em cães.²

Luciana Reichert da Silva Assunção^{1,3}, Celso Koogi Sonoda⁴, Suely Regina Mogami Bomfim⁵, Roberta Okamoto⁴, Marjorie de Assis Golim⁶, Sandra Helena Penha de Oliveira^{2*†}, Célio Percinoto^{1*†}

¹Departamento de Odontopediatria, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, Rua José Bonifácio, 1193, Araçatuba, SP, 16015050, Brasil

²Departamento de Ciências Básicas, Laboratório de Farmacologia, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, Rodovia Marechal Rondon Km 527/528 Câmpus Universitário, Prédio 31, Araçatuba, SP, 16018-805, Brasil

³Disciplina de Clínica Odontopediátrica, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Pará, UFPa, Rua Augusto Correa, 1, Câmpus Universitário, Belém, PA, 66075900, Brasil

⁴Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, Rua José Bonifácio, 1193, Araçatuba, SP, 16015050, Brasil

⁵Departamento de Clínica e Cirurgia e Reprodução Animal, Curso de Veterinária, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, Rua José Bonifácio, 1193, Araçatuba, SP, 16015050, Brasil

⁶Laboratório de Citometria de Fluxo, Divisão de Hemocentro, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Distrito de Rubião Júnior, s/n, Botucatu, SP, 18618970, Brasil

* autores para correspondência: percinoto@foa.unesp.br, shpoliv@foa.unesp.br

† professores orientadores do trabalho

Engenharia dos Tecidos Periodontais após Reimplante Dentário.

Palavras-chaves: Reimplante dentário. Plasma Rico em Plaquetas. Células-tronco. Medula óssea.

Número de Palavras no Resumo: 200

Número de Palavras no Texto: 3761

Número de Tabelas e Figuras: 4

Número de Referências: 35

¹ Texto escrito segundo as normas da revista *Journal of Dental Research* (Anexo D)

² Baseado em estudo de tese submetida à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, para obtenção do título de Doutor em Odontopediatria

RESUMO

Plasma pobre em plaquetas (PPP), Plasma rico em plaquetas (PRP) e Células-tronco da medula óssea (BMSC) constituem uma abordagem em Engenharia Tecidual. O efeito do PPP, PRP ativado ou não por trombina (PRP/TR) e células-tronco da medula óssea foram avaliados em dentes reimplantados de cães. PRP e PPP foram obtidos através da veia jugular dos animais. BMSC foram obtidas por aspiração da medula óssea (BMA) e a citometria de fluxo (FCA) realizada após BMA utilizando CD34 e CD90. Após 30 minutos da extração, os dentes foram reimplantados com os materiais: (i) PPP, (ii) PRP, (iii) PRP/TR e (iv) BMSC/PRP. Dentes reimplantados sem os materiais foram usados como controle. Análises histológica, histomorfométrica e imunohistoquímica foram realizadas 120 dias após o reimplante. FCA mostrou 55.98% de CD34+ e 32.67% de CD90+ após BMA. PRP e BMSC/PRP apresentaram maiores áreas de reabsorção por substituição (RS), com intensa imunomarcção para osteopontina. PPP e PRP/TR obtiveram melhores resultados; PRP/TR apresentou nenhuma RS. Por outro lado, PPP mostrou áreas de reabsorção inflamatória, com imunomarcção para fosfatase ácido tartarato resistente (TRAP). Os achados deste estudo experimental sugerem que o uso da trombina no preparo do PRP desempenha um importante papel na regeneração de tecidos após reimplante dentário.

INTRODUÇÃO

A avulsão dentária é um trauma que resulta na perda da continuidade de um complexo e múltiplo compartimento de tecidos (Barret e Kenny, 1997). A reinserção dos tecidos de conexão à superfície radicular, após a avulsão, depende de eventos de cicatrização que ocorrem de forma seqüencial. Um coágulo é formado entre as duas partes do ligamento periodontal rompido e, durante o processo de coagulação o fibrinogênio é convertido em fibrina. A fibrina desempenha um importante papel na cicatrização da ferida por sua capacidade de se unir à fibronectina, e provocar a migração de fibroblastos e a angiogênese (Dvorak *et al.*, 1987). Derivados do sangue incluindo plasma liofilizado e fibronectina foram utilizados com resultados satisfatórios em reimplantes experimentais (Nasjleti *et al.*, 1986; Nasjleti *et al.*, 1987a).

Atualmente, as frações plasmáticas, Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e também o Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) têm sido utilizado na regeneração de uma variedade de tecidos, incluindo osso (Gonshor, 2002), cartilagem (Nagae *et al.*, 2007), tendões (Kon *et al.*, 2009) e tecidos periodontais (Tözüm *et al.*, 2006). O Plasma Rico em Plaquetas é uma mistura de fatores de crescimento e cola modificada de fibrina autógena (Marx *et al.*, 1998), enquanto que, o Plasma Pobre em Plaquetas é altamente concentrado em fibrinogênio (Dohan *et al.*, 2006).

A busca da excelência da regeneração tem sido alvo de um campo novo e promissor denominado Engenharia Tecidual. O mecanismo da engenharia tecidual é estruturado sobre uma tríade composta de células, fatores de crescimento e um arcabouço (Bianco e Robey, 2001). As células-tronco mesenquimais com capacidade de gerar outros tecidos, como osso, cartilagem, músculo, tendão e tecidos de conexão, tem sido o alvo de pesquisas nessa área (Risbud e Shapiro, 2005). Estudos também têm relatado resultados promissores na utilização do PRP como arcabouço (*scaffold*) para células-tronco mesenquimais indiferenciadas (Yamada *et al.*, 2004).

O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta tecidual em dentes reimplantados de cães utilizando o plasma pobre em plaquetas (PPP), plasma rico em plaquetas (PRP), ativado ou

não por trombina, e células-tronco da medula óssea (BMSC) associadas ao PRP, analisando o potencial regenerador destes materiais nos tecidos periodontais.

MATERIAL & MÉTODO

Modelo Experimental

O modelo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em experimentação animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, UNESP. Quatro cães mestiços adultos, com idade média de 1 ano, foram submetidos aos procedimentos sob efeito de anestesia geral, utilizando injeção intramuscular de cloridrato de xilazina (0,05mL/Kg/peso) e uma associação de cloridrato de tiletamina e cloridrato de zolazepam (0,2mL/Kg/peso). Os dentes utilizados foram os incisivos centrais e laterais superiores, os incisivos laterais e intermédios inferiores e os segundos pré-molares e terceiros pré-molares da maxila e mandíbula, totalizando 16 dentes em cada cão. Um dos animais apresentava agenesia dos segundos pré-molares superiores e inferiores, sendo utilizados os incisivos centrais inferiores, resultando em 14 dentes neste animal.

Procedimento Cirúrgico

Em uma sessão anterior ao reimplante, os elementos dentários foram inicialmente submetidos ao tratamento endodôntico, utilizando o cimento de hidróxido de cálcio (Sealapex, Sybron Endo, Glendora, EUA) como material obturador. Após 2 semanas, os dentes foram extraídos para a realização do reimplante experimental. Nos dentes pré-molares, as raízes foram seccionadas previamente à extração, totalizando 24 raízes em cada cão, exceto em um dos animais, com agenesia dos segundos pré-molares, com 16 raízes. Após 30 minutos em meio seco, os dentes foram reimplantados e realizada contenção durante 7 dias. Nos pré-molares, a contenção foi obtida pela união das duas metades da coroa, previamente seccionadas, com resina composta fotopolimerizável. Dentes reimplantados sem o material foram utilizados como controle (Grupo I). Grupos II, III, IV e V constituíram,

respectivamente, reimplante com Plasma Pobre em Plaquetas (PPP); reimplante com Plasma Rico em Plaquetas ativado por cloreto de cálcio (PRP); reimplante com Plasma Rico em Plaquetas ativado por trombina e cloreto de cálcio (PRP/TR) e células-tronco associadas ao PRP ativado por cloreto de cálcio (BMSC/PRP). Cada material foi utilizado em um animal diferente. Antes e após o reimplante, os animais foram medicados com espiramicina associado ao metranidazol, na dosagem de 2mg/Kg de peso, e com cloridrato de tramadol na dosagem de 2mg/Kg durante 6 dias após o ato operatório. Os animais receberam ração adicionada ao leite durante 15 dias após o procedimento.

Preparo do Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) e Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

Um volume variando entre 10 e 50 mL de sangue autólogo foi coletado de cada animal através de canulação da veia jugular, em uma seringa contendo anticoagulante ácido citrato dextrose (ACD-A), na proporção de 5:1. A amostra de sangue foi centrifugada a 160g/ 22°C durante 20 minutos para separar o plasma que contém as plaquetas das células vermelhas (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha). A camada superficial de plasma foi removida e novamente centrifugada a 400g/22°C durante 15 minutos, resultando em duas camadas: a superior contendo o Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) e a inferior, com o Plasma Rico em Plaquetas (PRP). Líquido de Brecher foi utilizado para lisar os eritrócitos e diluir a amostra inicial de sangue periférico e de PPP e PRP para a contagem das plaquetas. As amostras foram contadas manualmente em câmara de Neubauer. Nos quatro animais, a contagem de plaquetas do sangue periférico foi de 147.500, 192.500, 177.500 e 147.500 plaquetas/ μ l, sendo que a quantidade de células plaquetárias no PRP foi, na mesma ordem, de 820.000, 615.000, 715.000 e 710.000 plaquetas/ μ l. Na amostra utilizada no Grupo II, a quantidade de plaquetas contida no PPP foi de 52.500 plaquetas/ μ l.

Um total de 200 μ l de cada material foi transferido a um recipiente de plástico estéril para serem colocados no alvéolo previamente ao reimplante. Uma quantidade de 10 μ l de

solução de cloreto de cálcio a 10% foi utilizado para ativar ambas as amostras de plasma pobre em plaquetas (Grupo II) e plasma rico em plaquetas (Grupos III e V) (0,05 mL de cloreto de cálcio para cada 1 mL de plasma rico em plaquetas ou plasma pobre em plaquetas) (Messora *et al.*, 2008). Para o reimplante dos dentes do Grupo IV, o plasma rico em plaquetas foi ativado com 28,58µl de 10.000 U de trombina de origem bovina em pó (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) dissolvida em 10 mL de cloreto de sódio a 10% (Yamada *et al.*, 2004). Os materiais foram ativados imediatamente antes de sua utilização nos reimplantes.

Separação das Células-tronco da Medula Óssea (BMSC)

Um total de 2,5 mL de material foi aspirado da medula óssea da crista do osso íliaco do cão, utilizando uma agulha especial para punção da medula óssea (Komiyaishi, Japão) associado a 1,5 mL de heparina sódica. O material coletado foi diluído inicialmente em solução salina a 0,9% na proporção de 1:1, transferido para 15 mL de Ficoll-PaqueTM Plus (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia) e submetido à centrifugação inicial a 400g/20°C durante 30 minutos. A camada mediana (*buffy coat*) foi então transferida a um novo tubo e diluída em solução salina a 0,9%. A suspensão foi então centrifugada a 450g/20°C durante 5 minutos. As células foram lavadas 3 vezes, ressuspensas em 10 mL de meio DMEM (Invitrogen Corporation, Grand Isle, Estados Unidos) e contadas manualmente em câmara de Neubauer utilizando o azul de tripano para diferenciar as células viáveis das não viáveis. A seguir, um total de $3,08 \times 10^6$ células foram ressuspensas em 200µl de PRP contido no recipiente de plástico. No momento de sua utilização, o material foi ativado com 10% de cloreto de cálcio.

Análise por Citometria de Fluxo

Após a contagem manual em câmara de Neubauer, 5×10^5 células foram suspensas em 100 µL tampão fosfato citrato- PBS (pH 7,4). As células foram marcadas com anticorpos específicos conjugados a fluorocromos: Anti-CD90-canino (Thy-1) (AbD Serotec, Oxford,

Reino Unido) e identificado pelo secundário *Rabbit F(ab')₂ Anti-rat IgG* conjugado a ficoeritina-R (RPE) (AbD Serotec, Oxford, Reino Unido) e Anti-CD34-canino conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (AbD Serotec, Oxford, Reino Unido). As células foram analisadas no citômetro de fluxo modelo FACScalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, Estados Unidos).

Análises Histomorfológica e Histomorfométrica

Decorrido o período de 120 dias após o reimplante, os animais foram sacrificados e as peças de interesse foram separadas, fixadas em solução formalina a 10% (Água Régia Química, Araçatuba, SP, Brasil) e descalcificadas em solução de ácido fórmico e citrato de sódio (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) (Morse, 1945). Após a descalcificação, os cortes foram processados e embebidos em parafina. Cortes seriados de 6µm foram cortados no sentido longitudinal e corados com hematoxilina e eosina e Tricrômio de Masson. Doze cortes histológicos representativos de cada grupo foram selecionados para a análise histomorfométrica para aumentar a confiabilidade dos dados utilizados na análise estatística. As imagens dos cortes foram capturadas por uma câmera digital (Leica DFC 500, Leica, Wetzlar, Alemanha) acoplada ao microscópio óptico (Leica DM 4000 B, Leica, Wetzlar, Alemanha) conectado ao computador utilizando o *Software Leica Qwin* (versão Plus, Leica, Wetzlar, Alemanha) em um aumento de 2,5X e armazenadas como figuras (tif 24). Como não foi possível capturar a porção radicular de interesse em uma mesma imagem devido ao tamanho das raízes, as imagens foram unidas utilizando programa de editor de fotos (Corel Drawn X3, Corel Corporation, Versão 13.0.0.739). O programa ImageLab 2000 (Diracon Bio Informática Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brasil) foi utilizado para a quantificação das áreas de reabsorções de superfície, por substituição e inflamatória.

Análise de Imuno Histoquímica

Marcações de imuno histoquímica para Osteopontina (OP) e Fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP) foram realizadas em todos os espécimes utilizando o método de detecção por imunoperoxidase. Enquanto OP é uma proteína extracelular sintetizada pelos osteoblastos nos estágios iniciais de formação óssea (Thorwarth *et al.*, 2005), TRAP é uma enzima lisossômica presente nos odontoclastos e osteoclastos (Minkin, 1982; Sahara *et al.*, 1996). Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-OC e anti-OP produzido em *goat* (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). O anticorpo biotilado *rabbit anti-goat* (Jackson Immuno Research Laboratory, USA) foi utilizado como secundário na diluição de 1:200. Os tecidos foram contramarcados utilizando-se o complexo avidina-biotina (Vectastain® Elite ABC, Vector, Burlingame, CA, Estados Unidos) e depois corados em uma solução substrato de peroxidase por 10 minutos (DAKOCytomation, Kioto, Japão). Os tecidos foram contracorados com hematoxilina de Harris. Todas as amostras foram acompanhadas por um controle negativo.

Análise Estatística

Os resultados foram avaliados com o auxílio do programa Bioestat, versão 5.0 (Ayres *et al.*, 2007). A análise estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA) e o teste *post-hoc* de Tukey para as comparações individuais entre os grupos, utilizando-se nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Caracterização Celular por Citometria de Fluxo

As células presentes no material de coleta da medula óssea tiveram marcações positivas para CD-34 em uma proporção de 55,98% do total de células (Figura 1A). Células positivas para CD-90 (Thy-1) mostraram a presença de duas populações distintas, sendo a maior correspondendo a 26,59% e a menor de 6,69% do total de células presentes no material

da coleta (Figura 1B), sugerindo a presença de uma população heterogênea de células na medula óssea.

Análise Histológica Qualitativa

Grupo I (Controle)- Os espécimes que apresentavam dentina e cimento com integridade, mostravam a presença de cimento secundário sobre essas estruturas e o ligamento periodontal (LP) ocupado com feixes de fibras colágenas com discretas formações ósseas (Fig. 2A). Foi observado também, neste grupo, espécimes com tecido ósseo neoformado em contato com a superfície de dentina e cimento, mostrando também extensas áreas com reabsorção cemento-dentinária (Fig. 2B).

Grupo II (PPP)- A grande maioria dos espécimes que pertenciam a este grupo apresentou discretas áreas de reabsorção ocupada por cimento secundário (Fig. 2C). Em algumas regiões de quatro espécimes, o tecido ósseo neoformado ocupava praticamente o espaço periodontal, observando-se também extensas áreas de reabsorção cemento dentinária ocupada por tecido conjuntivo (Fig. 2D)

Grupo III (PRP)- Este grupo foi marcado com áreas de reabsorção superficiais e também por extensas áreas de osso neoformado ocupando o espaço do ligamento periodontal. Em alguns casos, o espaço do LP encontrava-se ocupado parcialmente por cimento secundário e/ou tecido ósseo, ocasionando o seu estreitamento (Fig. 2E). Em outros espécimes, o espaço do LP praticamente foi ocupado por tecido ósseo neoformado com ausência de cimento (Fig. 2F).

Grupo IV (PRP/TR) - Na maioria dos espécimes, a camada de cimento encontrava-se com integridade. Neste grupo, foi evidenciado áreas de reabsorções cemento-dentinárias, porém, a maioria delas, encontravam-se inativas e ocupadas por tecido conjuntivo com discreto número de fibroblastos (Fig. 2G). Em alguns espécimes, notou-se o estreitamento do LP, ocasionado pelo cimento neoformado e tecido ósseo da parede alveolar (Fig. 2H).

Grupo V (BMSC/PRP)- Entre todos os grupos analisados, este grupo foi o que apresentou o maior número de espécimes com tecido ósseo neoformado em contato com área de dentina reabsorvida (Fig. 2I). Em quatro espécimes, notou-se o espaço do LP irregular e encontrava-se ocupado por tecido conjuntivo com discreto número de fibroblastos (Fig. 2J).

Análises Histomorfométrica e Estatística

Após a quantificação em valores absolutos (mm^2) das reabsorções de superfície, por substituição e inflamatória, esses valores foram transformados em valores relativos (em porcentagem). A normalidade e homogeneidade dos dados foram verificados e submetidos à análise estatística. As médias dos três tipos de reabsorções estão documentadas na Figura 3. Foi observada uma correlação estatisticamente significativa para a reabsorção de superfície entre os Grupos PRP/TR e BMSC/PRP (Fig. 3A) e para a reabsorção por substituição entre o grupo BMSC/PRP e os demais, exceto com o Controle (Fig. 3B). Não foram observadas relações estatisticamente significantes na análise da reabsorção inflamatória quando os cinco grupos foram comparados (Fig. 3C).

Análises de Imuno Histoquímica

O Grupo Controle apresentou imunomarcações positivas para a OP em células de linhagem osteoblástica na região do ligamento periodontal (Fig. 4A). OP foi bem evidente nas imunomarcações de linhagem osteoblástica nos Grupos PRP e BMSC/PRP, especialmente nas áreas de reabsorção por substituição (Figs. 4B). O Grupo TR/PRP mostrou marcações intensas para OP na linhagem osteoblástica em regiões do ligamento periodontal e superfície radicular (Fig 4C). Imunomarcações positivas para OP foram observadas na linhagem osteoclástica no Grupo PPP. A linhagem de células osteoclásticas também foram marcadas pela TRAP nos Grupos PPP (Fig. 4D) e BMSC/PRP (Fig. 4E) em regiões de superfície dentária e osso alveolar. Nos demais grupos, as imunomarcações para a TRAP foram menos evidentes (Fig. 4F).

DISCUSSÃO

A regeneração de tecidos periodontais deve alcançar quatro critérios para que seja essencialmente satisfatória: restabelecimento de um epitélio funcional, inserção do tecido de conexão (fibras de Sharpey) no cimento radicular, neoformação de cimento na raiz exposta e restauração do osso alveolar dentro de 2mm da junção cimento-esmalte (Bartold *et al.*, 2000). O presente estudo avaliou o potencial regenerador de produtos de origem biológica nos tecidos periodontais após o reimplante dentário.

Excetuando o Grupo IV (PRP/TR), observamos resultados menos satisfatórios nos dentes pré-molares devido à maior presença de reabsorções por substituição e inflamatória quando comparado aos incisivos. Esta falta de uniformidade dos resultados opõe-se aos achados de outros autores que também utilizaram estes dentes em estudos com reimplantes dentários (Trope e Friedman, 1992; Sae-lim *et al.*, 1998), porém não observaram esta diferença. Como os dentes pré-molares são utilizados para a mastigação, o excesso de trauma oclusal poderia ter facilitado a ocorrência maior de anquilose neste grupo (Andreasen, 1981). Já a presença de reabsorção inflamatória pode estar relacionada à própria metodologia empregada de seccionamento das raízes dos pré-molares o que poderia causar a formação de nichos, facilitando o acúmulo de microorganismos nessas regiões. Entretanto, de uma forma geral, a reabsorção inflamatória foi observada em poucos espécimes, demonstrando a efetividade do tratamento endodôntico realizado e da antibioticoterapia empregada (Andreasen, 1987).

Alguns espécimes do Grupo I (Controle) apresentaram reparo da superfície radicular com a presença de cimento secundário neoformado em áreas de reabsorção. Por outro lado, este grupo foi o segundo onde a reabsorção por substituição foi mais observada. Esta alteração foi também evidenciada através das imunomarcações positivas para OP presentes no ligamento periodontal. A reabsorção por substituição está fortemente relacionada à presença

de um ligamento periodontal não vital sobre a superfície radicular (Andreasen e Kristerson, 1981).

O Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) é um material rico em fibrinogênio, originando também outra nomenclatura dada a esse material que é *Plasma Rico em Fibrinogênio (PRF)* e também é considerado uma cola de fibrina autóloga (Floryan e Berghoff, 2004). A fibrina desempenha importantes papéis na cicatrização, incluindo indução da angiogênese, quimiotaxia de monócitos (Dvorak *et al.*, 1987) e migração de fibroblastos (Knighton *et al.*, 1982). De uma forma geral, foram encontrados bons resultados nos espécimes do Grupo II (PPP), apresentando ausência de reabsorção por substituição e reabsorção inflamatória em 8, dos 12 cortes analisados por histomorfometria. Por outro lado, este grupo foi aquele onde o maior índice de reabsorção do tipo inflamatória foi observado, sendo esta ocorrência confirmada pelas imunomarcações para células de linhagem osteoclásticas pelos anticorpos OP e TRAP.

A estratégia terapêutica do plasma rico em plaquetas (PRP) fundamenta-se na aceleração da cicatrização por meio da concentração de fatores de crescimento, iniciadores universais de quase todos os eventos cicatriciais (Everts *et al.*, 2006). A formação do gel de PRP se dá pela ação de substâncias que neutralizam a ação do anticoagulante, sendo as mais utilizadas a associação de cloreto de cálcio e trombina bovina (Marx *et al.*, 1998) ou somente o cloreto de cálcio (Messora *et al.*, 2008). Quando analisados os resultados do Grupo III (PRP), onde o plasma rico em plaquetas foi ativado apenas por cloreto de cálcio, observamos alguns espécimes com uma boa resposta de reparo das estruturas periodontais, porém com uma tendência à substituição do espaço periodontal por tecido ósseo neoformado, fato este confirmado também pelas imunomarcações positivas para OP, que foram pronunciadas neste grupo. Diante da ação dos múltiplos fatores de crescimento presentes nas células plaquetárias os quais agem sob diferentes vias em diferentes populações celulares (Van Den Dolder *et al.*,

2006), poderia originar uma competição celular na presença desses peptídeos durante o reparo, contribuindo para os dois tipos de respostas teciduais observados no grupo III.

Surpreendentemente, quando utilizamos o PRP ativado com a associação de trombina de origem bovina e cloreto de cálcio (Grupo IV), não observamos, em nenhum espécime, a reabsorção por substituição. A trombina ou fator II ativado é uma proteína do tipo protease serina e realiza um papel fundamental na ativação da cascata de coagulação e na indução da formação da matriz de fibrina e no coágulo sanguíneo. Estudos demonstram que a trombina pode ser liberada a partir de um coágulo de fibrina e causar ativação ou estimular a proliferação de células teciduais adjacentes, incluindo células endoteliais (Herbert *et al.*, 1994) e fibroblastos (Chan *et al.*, 1998). Em um estudo *in situ*, foi demonstrado que a trombina foi capaz de estimular o crescimento dos fibroblastos, aumentar a síntese de colágeno e causar significantes alterações morfológicas nessas células, provocando uma maior união entre as células, alterações na orientação das fibras e aumento do espaço intercelular (Chan, 1998). Apesar da reabsorção de superfície ter sido encontrada com frequência neste grupo, são consideradas auto-limitantes, apresentando um reparo com cimento neoformado (Andreasen e Andreasen, 1994), representando, assim, pouco significado clínico quanto ao prognóstico de dentes reimplantados.

A fração de células mononucleares obtidas da medula óssea contém células-tronco hematopoiéticas, progenitoras endoteliais e, em menor número, células-tronco mesenquimais (Strauer *et al.*, 2002). Duas populações distintas foram detectadas dentro da região positiva (M1) através de citometria de fluxo devido às diferenças de intensidade de expressão do anticorpo CD90. Esses dados sugerem que a população maior corresponde às células estromais presentes na fração mononuclear e que também são positivas para esse marcador. A glicoproteína CD90, conhecida também como Thy-1 (antígeno 1 de diferenciação do timócito), é um marcador de superfície de neurônios, timócitos, algumas linhagens de

fibroblastos e células mesangiais. Entre as células da medula óssea, algumas linhagens positivas para o CD34, também são expressas pelo marcador CD90, além das células endoteliais, presentes no estroma medular, expressam esse marcador (Bradley *et al.*, 2009).

Embora exista um maior potencial terapêutico em células-tronco mesenquimais submetidas a um processo de proliferação *in vitro* (Pittenger *et al.*, 1999), no presente estudo, este processo não foi realizado para que houvesse uma maior proximidade com a realidade clínica do trauma dentário. Estudos relataram bons resultados na utilização dessa fração celular no reparo de diversos tipos de tecidos (Filho-cerruti *et al.*, 2007; Strauer *et al.*, 2002). As diferenças entre os Grupos III (PRP) e V (BMSC/PRP) quanto à presença da reabsorção por substituição sugere alguma influência das células da medula no aumento do reparo por tecido ósseo no Grupo V, já que, a metodologia para ativação do PRP foi a mesma utilizada nos dois grupos. Mesmo encontrando-se em um número reduzido, as células-tronco mesenquimais poderiam ter sofrido a ação dos fatores de crescimento presentes no PRP, colaborando para a diferenciação dessas células em células osteoblásticas. Células-tronco da medula óssea associadas ao PRP foram capazes de produzir neoformação de tecido ósseo *in vivo* (Filho-Ferrucci *et al.*, 2007).

Dentro dos limites deste estudo, podemos concluir que o uso da trombina no preparo do PRP desempenha um importante papel na regeneração de tecidos após reimplante dentário. O PRP ativado por cloreto de cálcio não mostrou ser um *scaffold* apropriado para células indiferenciadas no reparo de dentes avulsionados. Estudos adicionais tornam-se necessários para testar outros tipos de materiais que apresentem uma melhor resposta como arcabouço destas células em reimplantes dentários.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi suportado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (auxílio-pesquisa nº 06/59420-5).

REFERÊNCIAS

- Andreasen JO (1981). The effect of excessive occlusal trauma upon periodontal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Swed Dent J* 5:115-122.
- Andreasen, JO (1987). Experimental dental traumatology: development of a model for external root resorption. *Endod Dent Traumatol* 3:269-287.
- Andreasen JO, Andreasen FM, editors (1994). Textbook and color atlas of traumatic injuries to the teeth. Copenhagen: Munksgaard.
- Andreasen JO, Kristerson L (1981). The effect of limited drying or removal of periodontal ligament. Periodontal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Acta Odontol Scand* 39:1-13.
- Barret EJ, Kenny DJ (1997). Avulsed permanent teeth: a review of the literature and treatment guidelines. *Endod Dent Traumatol* 13:53-163.
- Bartold PM, McCulloch G, Narayanan AS, Pitaru S (2000). Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *J Periodontol* 24:253-269.
- Bianco P, Robey PG (2001). Stem cells in tissue engineering. *Nature* 414:118-121.
- Bradley JE, Ramirez G, Hagood JS (2009). Roles and regulation of Thy-1, a context-dependent modulator of cell phenotype. *Biofactors* 35:258-265.
- Chan CP, Lin CP, Chang MC, Hsieh CC, Hsu CC, Lin CL, *et al* (1998). Effects of thrombin on the growth, protein synthesis, attachment, clustering and alkaline phosphatase activity of cultured human periodontal ligament fibroblast. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 22:137-143.
- Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, *et al* (2006). Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 101:e37-44
- Dvorak HF, Harvey VS, Estrella P, Brown LF, McDonagh J, Dvorak AM (1987). Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implication for tumor stromal generation and wound healing. *Lab Invest* 57:673-686.

Everts PAM, Knape JT, Weibrich G, Schönberger JP, Hoffman J, Overdevest EP, *et al* (2006). Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol* 38:174-187.

Filho Cerruti H, Kerkis I, Kerkis A, Tatsui NH, Da Costa Neves A, Bueno DF, *et al* (2007). Allogeneous bone grafts improved by bone marrow stem cells and platelet growth factors: clinical case reports. *Artif Organs* 31:268-273.

Floryan KM, Berghoff WJ (2004). Intraoperative use of autologous platelet-rich plasma and platelet-poor plasma for orthopedic surgery patients. *AORN J* 80:668-674.

Gonshor A (2002). Technique for producing platelet rich plasma and platelet concentrate. *Int J Periodontics Restorative Dent* 22:547-557.

Herbert JM, Dupuy E, Laplace MC, Zini JM, Bar Shavit R, Tobelem G (1994). Thrombin induces endothelial cell growth via both a proteolytic and non-proteolytic pathway. *Biochem J* 303:227-231.

Knighton DR, Hunt, TK, Thakral KK, Goodson WH 3rd (1982). Role of platelets and fibrin and the healing sequence: an in vivo study of angiogenesis and collagen synthesis. *Ann Surg* 196:379-388.

Kon E, Filardo G, Delcogliano M, Presti ML, Russo A, Bondi A, *et al* (2009). Platelet rich plasma: new clinical application. A pilot study for treatment of jumper's knee. *Injury* 40:598-603.

Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR (1998). Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85:638-646.

Messora MR, Nagata MJH, Mariano RC, Dornelles RCM, Bonfim SEM, Fucini SE, *et al* (2008). Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvária. *J Periodont Res* 43:217-223.

Minkin C (1982). Bone-acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 34:285-290.

Nagae M, Ikeda T, Mikamy Y, Hase H, Ozawa H, Matsuda K, *et al* (2007). Invertebral disc regeneration using platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel microspheres. *Tissue Eng* 13:147-158.

Nasjleti CE, Caffesse RG, Castelli WA, Lopatin DE, Kowalski CJ (1986). Effect of lyophilized autologous plasma on periodontal healing of replanted teeth. *J Periodontol* 57:568-578.

Nasjleti CE, Caffesse RG, Castelli WA, Lopatin DE, Kowalski CJ (1987a). Effect of fibronectin on healing of replanted teeth in monkeys: a histologic and autoradiographic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 63:291-299.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, *et al* (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.

Risbud MV, Shapiro IM (2005). Stem cells in craniofacial and dental tissue engineering. Stem cells in craniofacial and dental tissue engineering. *Orthod Craniofac Res* 8:54-59.

Sae-Lim V, Metzger Z, Trope M (1998). Local dexamethasone improves periodontal healing of replanted dog's teeth. *Endod Dent Traumatol* 14:232-236.

Sahara N, Toyoki A, Ashizawa Y, Deguchi T, Suzuki K (1996). Cytodifferentiation of the odontoclast prior to the shedding of human deciduous teeth: an ultrastructural and cytochemical study. *Anat Rec* 244:33-49.

Shi S, Gronthos S (2003). Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner R* 18:696-704.

Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Köstering M, Hernandez A, Sorq RV, *et al* (2002). Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 106:1913-1918.

Tözüm TF, Keçeli HG, Serper A, Tuncel B (2006). Intentional replantation for a periodontally involved hopeless incisor by using autologous platelet-rich plasma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 101:119-124.

Trope M, Friedman S (1992). Periodontal healing of replanted dog teeth in Viaspan, milk and Hank's balanced salt solution. *Endod Dent Traumatol* 8:183-188.

Thorwarth M, Rupprecht S, Falk S, Felszeghy E, Wiltfang J, Schlegel KA (2005). Expression of bone matrix proteins during de novo bone formation using a bovine collagen and platelet-rich plasma (prp)—an immunohistochemical analysis. *Biomaterials* 26:2575-2584.

Van Den Dolder J, Mooren R, Vloon AP, Stoelinga PJ, Jansen JA (2006). Platelet-rich plasma: quantification of growth factor levels and the effect on growth and differentiation of rat bone marrow cells. *Tissue Eng* 12:3067-3073.

Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Nagasaka T (2004). Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clin Oral Implants Res* 15:589-597.

Legenda das Figuras

Figura 1. (A) Uma média de 55.98 das BMSC após a coleta foram marcadas positivamente para CD34. (B) e 33.28% para CD90 por citometria de fluxo.

Figura 2. Cortes Histológicos (H&E). **Grupo Controle.** (A) Cimento secundário sobre dentina e cimento radiculares íntegros. (B) Áreas com reabsorção cimento-dentinária ocupadas por tecido ósseo neoformado. **Grupo PPP** (C) Áreas de reabsorção ocupada por cimento secundário. (D) Áreas de reabsorção cimento dentinária ocupada por tecido conjuntivo. **Grupo PRP** (E) Estreitamento do LP. (F) Espaço do LP ocupado por tecido ósseo neoformado e ausência de cimento. **Grupo PRP/TR** (G) Reabsorções cimento-dentinárias inativas. (H) Estreitamento do LP. **Grupo BMSC/PRP** (I) Tecido ósseo neoformado em contato com dentina reabsorvida. (J) LP irregular com discreto número de fibroblastos.

Figura 3. Médias dos valores relativos de comprometimento radicular quanto: (A) Reabsorção de superfície. (B) Reabsorção por substituição. (C) Reabsorção inflamatória.
* estatisticamente significativa em $p < 0.05$.

Figura 4. Expressão de OP: (A) Grupo Controle, (B) Grupo PRP, (C) Grupo TR/PRP. Expressão de TRAP: (D) Grupo PPP, (E) Grupo BMSC/PRP, (F) Grupo Controle.
d=dentina; LP=Ligamento periodontal; OA=osso alveolar

Figuras

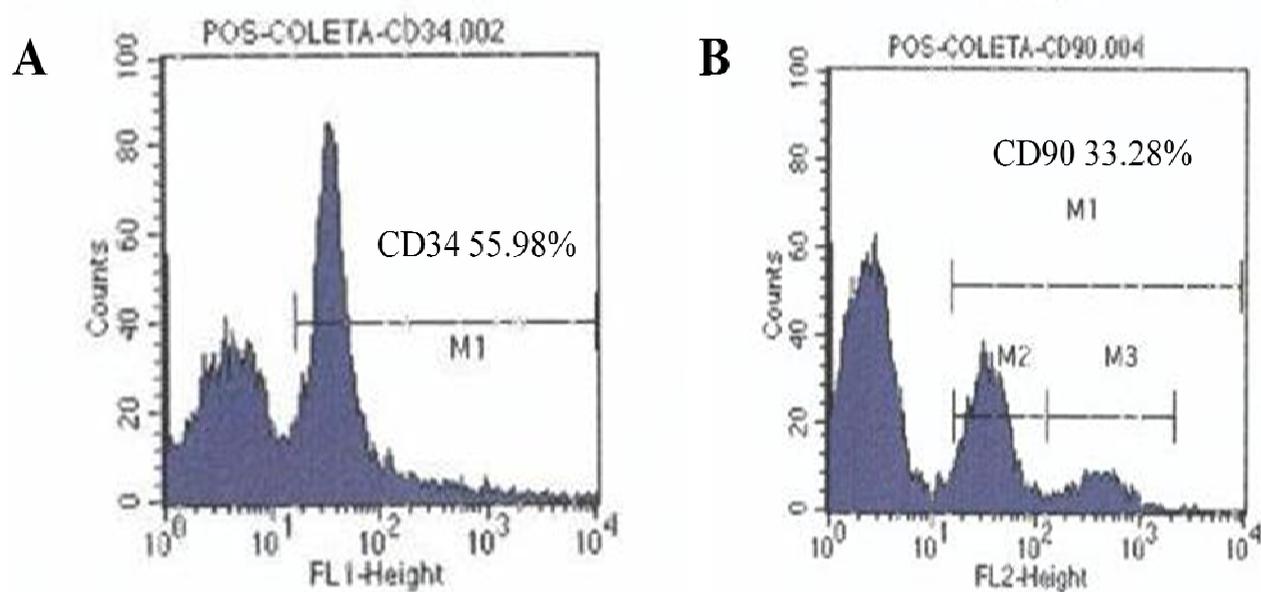


Figura 1

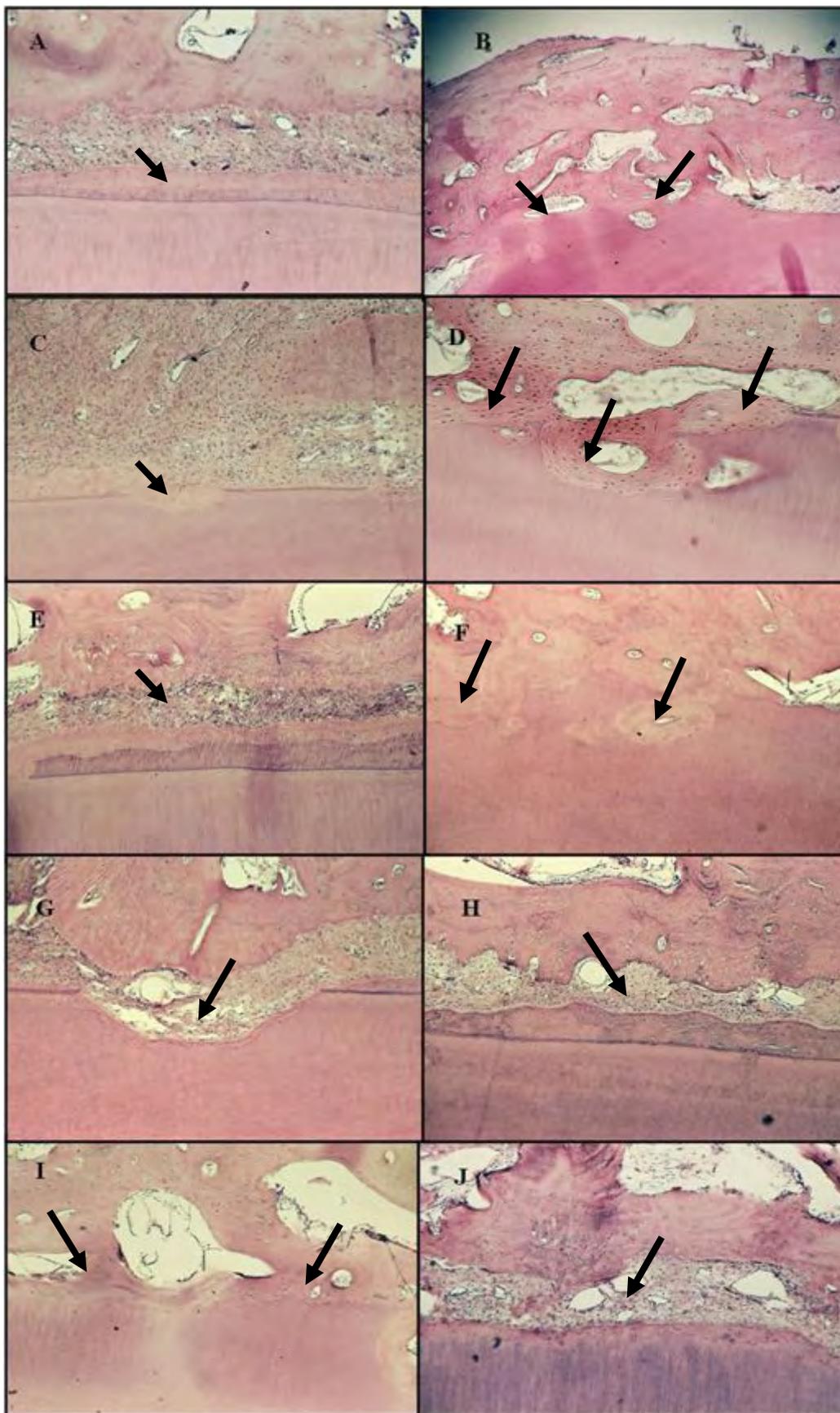


Figura 2

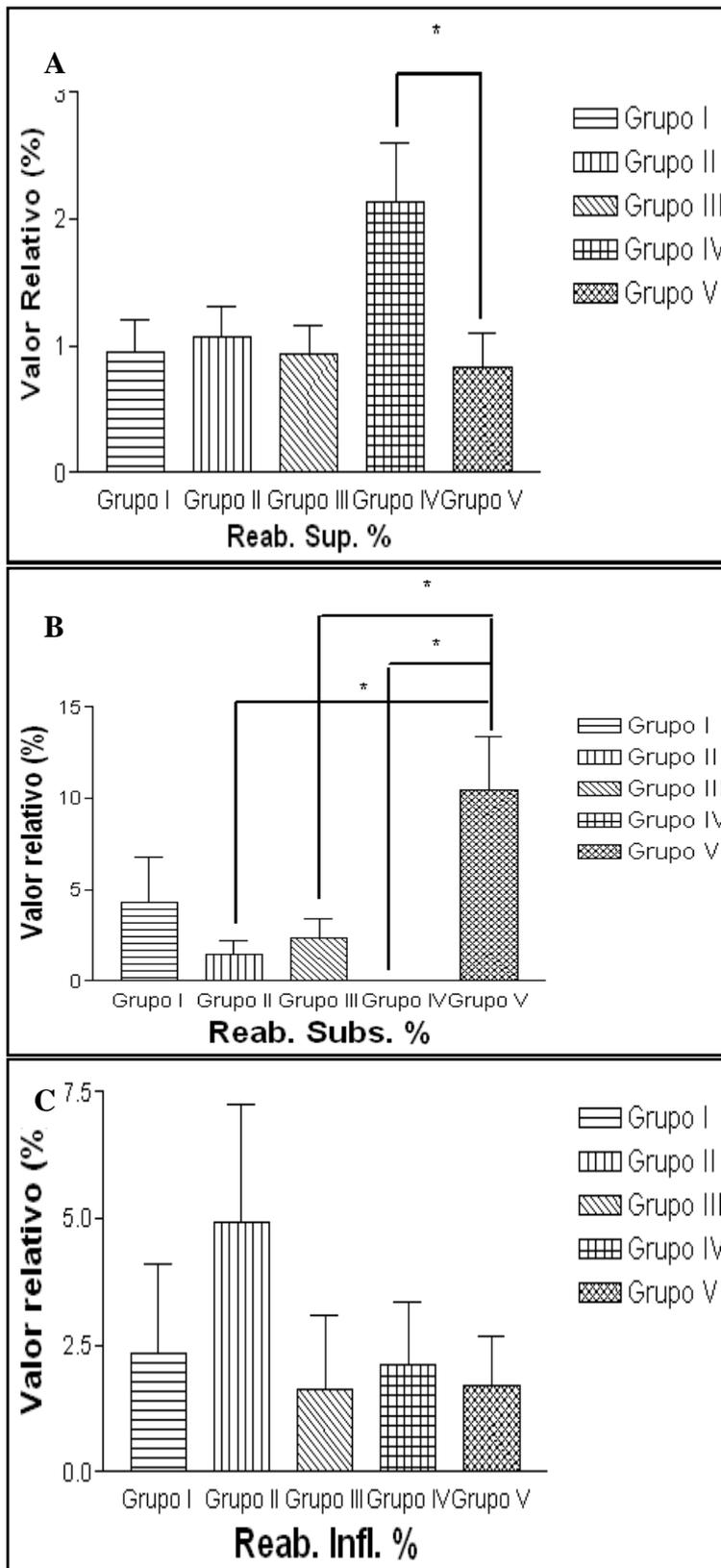


Figura 3

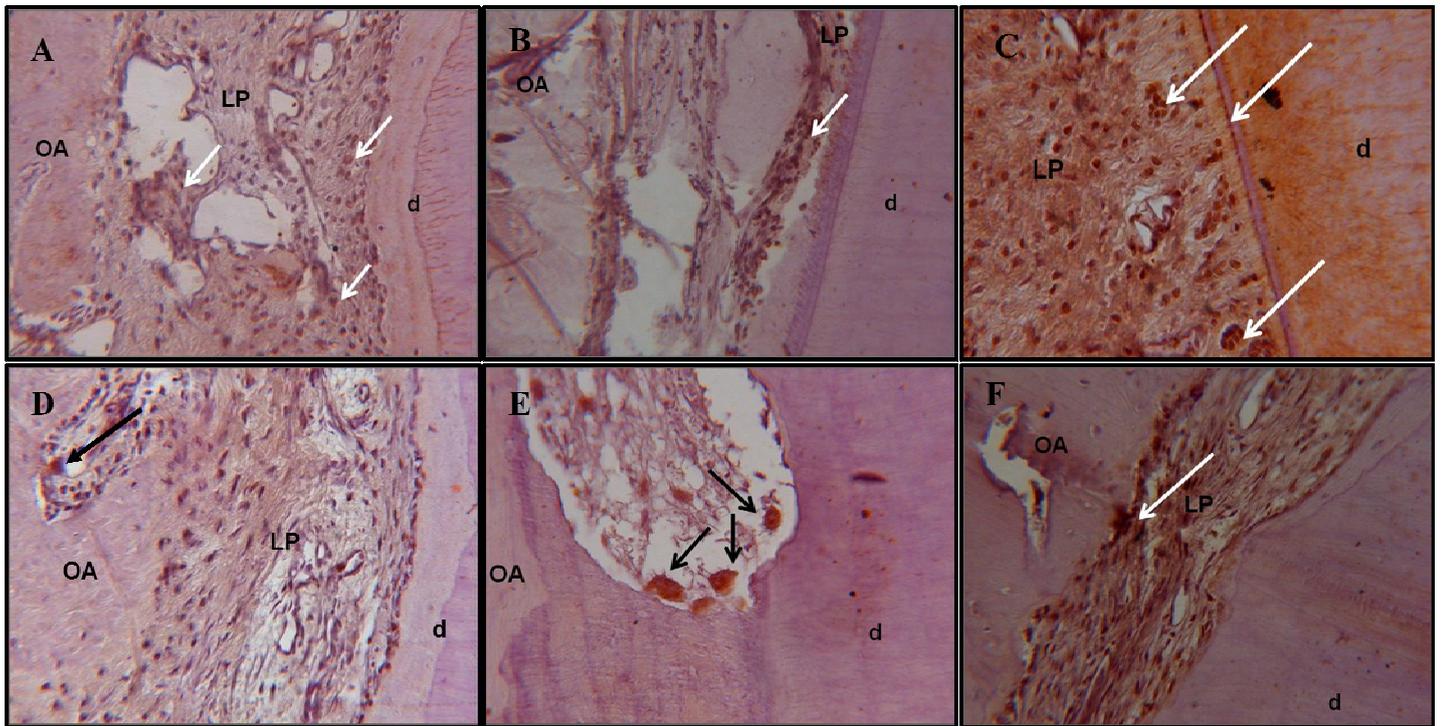


Figura 4



Anexo D

Normas para Publicação segundo o Periódico "Journal of Dental Research"

Official publication of International Association for Dental Research

Editor-in-Chief: Anthony J. Smith- University of Birmingham

Impact Factor: 3.496

GENERAL POLICY

Submitted manuscripts must be written clearly and concisely in English and represent unpublished original research that is not being considered for publication elsewhere. The *Journal* seeks to publish (i) concise definitive reports of wide interest to the research community and (ii) topical, concise reviews of the state of the art. Concise definitive reports of findings of unusual significance can be reviewed as (iii) Rapid Communications. Criteria for the acceptance of Rapid Communications will be more stringent than those for regular papers. Authors should request review for Rapid Communications in the cover letter to the Editor. The *Journal* also welcomes (iv) essays that explore seminal events and creative advances in the development of dental research for publication in the "Discovery!" column.

Reports of observations and the development of new methods or techniques may be considered for publication if they are of broad and fundamental interest, but the focus of the *Journal* is on definitive reports demonstrating cause-and-effect relationships. Submission of case reports is generally discouraged.

Letters to the Editor must include evidence to support a position about the scientific or editorial content of the *Journal* and are limited to 250 words. Guest Editorials describe a clear and substantiated position on issues of interest to the community and are also encouraged. These are limited to 1000 words. As appropriate, a brief response to Letters or Guest Editorials will be solicited for concurrent publication. Conference Reports will be considered for publication only if they are topical and brief, highlighting important new data or findings. Final approval for publication rests with the Editor.

Authors considering submitting a Conference Report should first consult the Editor regarding the suitability of the report. Such reports should: (a) be of broad and international interest to the readership of the *JDR*; (b) include the specific aims of the meeting, the pertinent information provided by the speakers (i.e., summary of a few sentences from each talk), then the specific conclusions; and (c) meet the same

word limits and figure/table numbers as a regular research report. An abstract is not required. Priority for publication would depend on our publishing schedule for regular research reports, which generally carry higher priority.

Submitted manuscripts must be accompanied by a cover letter with the signatures of all authors certifying that the research is (i) original, (ii) not presently under consideration for publication elsewhere, (iii) free of conflict of interest (e.g., edited by the funding agency or organization), and (iv) conducted by the highest principles of human subject and animal welfare. In the cover letter, contributors should nominate four expert, independent scientific referees and include their names, mailing addresses, telephone/FAX numbers, e-mail addresses, and area of expertise. It is highly encouraged that referees be nominated to avoid delays in the review process. Nominated scientific referees may not be colleagues at the contributors' institutions or present or former collaborators. The receipt of all manuscripts will be acknowledged. The contributors will be notified subsequently by the Editor of (1) acceptance, (2) need for revisions, or (3) rejection.

Also include a list of total words (from Abstract to Acknowledgments), number of words in Abstract, total number of tables and/or figures, and number of references.

All rights in manuscripts shall be transferred to the *Journal of Dental Research* upon submission. Submission of a manuscript shall constitute each author's agreement that the Journal of Dental Research holds all proprietary rights in the manuscript submitted, including all copyrights. On acceptance and before publication of a paper, contributors will be asked to sign a formal transfer of copyright.

For clarity, please use only common abbreviations, which will be widely recognized by the more general reader of the Journal. A list of all abbreviations used should be provided on the manuscript cover page.

RESEARCH REPORTS

(All submissions must adhere to the following criteria.) These will be limited to a maximum of 2500 words (including abstract, introduction, materials & methods, results, discussion, and acknowledgments, but excluding the reference list and figure legends), an abstract containing a maximum of 150 words, a maximum of 35 references, and a combined total of 4 tables/figures. Additional supporting data may be referenced as a supplemental appendix for publication online only. The appendix must be submitted with the manuscript for review. Research Reports will be published in three categories:

- Clinical
- Biomaterials & Bioengineering
- Biological

CONCISE REVIEWS

With the addition of content from the journal *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, the 'Concise Review' category in *JDR* will be discontinued, and manuscripts for Concise Reviews will no longer be considered.

CRITICAL REVIEWS IN ORAL BIOLOGY & MEDICINE

Critical Reviews in Oral Biology & Medicine manuscripts cannot be submitted online. Authors must contact the *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* editor, Dr. Dana Graves, at dgraves@iadr.org for submission instructions.

The manuscript should briefly summarize information that is well known and emphasize recent developments over the last three years. This will help focus the manuscript on cutting edge research. Please stress critical issues and concepts that would add excitement to the article. In addition, visual elements should be added to make the manuscript as "approachable" as possible. The manuscript should follow the following guidelines:

- It is important to include several illustrations or diagrams to enhance clarity. Manuscripts that lack figures or diagrams typically receive a low priority score. The cost of color figures in the print version will be borne by the authors. Rates for color reproduction are \$300 per initial page of color and \$150 for each additional page of color. However, there are no charges for figures and diagrams printed in black and white. Color figures may be included in the on-line version of *JDR* with no extra charges.
- Summarize important concepts in tables or flow charts or show critical data in the form of figures. Please note that you will need to obtain permission to reproduce a previously published figure or table.
- The length of the article with references and tables/figures should be approximately 35-40 double spaced, 8 X 11 inch typed pages with a 12 font size. The page limitation is enforced by the Journal. In addition, there should be as few abbreviations as possible. Due to the broad readership abbreviations commonly recognized in one field may not be readily apparent to those in a different field.
- The cover page, abstract (~200 words), text, summary, figure legends and tables should be combined into a single Word document and the Figures sent as a PDF file containing all figures. If the on-line version is to be in color and the printed version in B&W please submit separate PDF files for B&W and color figures. Note that the figures in both PDF files should be identical except that the B&W is in grayscale.
- Examples of recent review articles in *JDR* may be found at the following links:
<http://jdr.iadrjournals.org/cgi/content/full/86/9/800>
<http://jdr.iadrjournals.org/cgi/content/full/85/7/584>

DISCOVERY! ESSAYS

Readers are encouraged to submit *Discovery!* essays/articles that they feel will be of interest to the *JDR* readership. Authors are welcome to submit manuscripts for consideration directly to the *Discovery!* editor, Dr. Marty Taubman, at mtaubman@forsyth.org, or by mail to Dr. Marty Taubman, c/o The Forsyth Institute, 140 The Fenway, Boston, MA 02115, USA. *Discovery!* manuscripts cannot be submitted online. *Discovery!* manuscripts will be limited to 2500 words and two tables or figures.

MANUSCRIPTS

Prepare manuscript, tables, legends, and footnotes as double-spaced text (a minimum of 6 mm between lines) formatted for 8-1/2 x 11-inch paper. Top, bottom, and side margins should be one inch, with no indented paragraphs. Figures and tables should not exceed 8-1/2 x 11 inches. Both Macintosh (Framemaker, MacWrite, Word, WordPerfect, Works WP, or WriteNow) and IBM PC (DCA-RFT, FrameMaker, MultiMate, Office Writer, Text, Word for Windows, WordPerfect, WordStar, Works WP, or XYWrite) files will be accepted. Manuscripts should be "clean", i.e., free of tabs and codes. Bold and italic type should appear exactly as they will appear on the printed page. Italicize items that will appear in italics; this will include the genus and species of an organism, *g* (for gravitational force), Latin words and abbreviations (for example, e.g., i.e., in vitro, in vivo, et al.), and journal names in the References section. Tabs should be used to separate columns within tables. Do not use elaborate table formatting.

Use a standard font such as Times New Roman or Arial to avoid misrepresentation of your data on different computers that do not have the unusual or foreign language fonts.

Title and Section Headings

Bold type should be used for the title on page 1. Use upper- and lower-case letters. First-level headings, which include ABSTRACT, INTRODUCTION, MATERIALS & METHODS, RESULTS, DISCUSSION, ACKNOWLEDGMENTS, and REFERENCES should be bold type, all upper-case letters, as shown. Second-level subheads should be bold type, upper- and lower-case. Third-level subheads should be bold type, upper- and lower-case, with a paragraph indent. Any lower-ranked subheads should be italicized, and in upper- and lower-case. Please type no more than 10 characters per inch. Authors are reminded to include their complete mailing addresses, telephone, FAX, and e-mail addresses, as available. Copies of "in press" and "submitted" manuscripts that will provide essential information for the referees should also be enclosed.

A Few Words About Style

Authors should remember that they are writing to communicate to often-uninformed readers. Here are a few suggestions: Show a clear chronological progression and logic to the development of your ideas throughout the manuscript and within

paragraphs and sentences. Speak to the reader in a direct and straightforward voice. Tell the reader your purpose, then provide background, data, and conclusions. You will make your point most effectively by illustrating with a well-chosen example, rather than providing an encyclopedic discourse. In each paragraph and sentence, stick to the subject. For example, if the subject is "biophysical properties", don't write sentences in that paragraph that change the subject to the names of cited contributors. Each sentence should contain only one thought. Write short and simple sentences. Choose the best word so that you say what you mean. To make your information accessible to the widest possible audience, avoid jargon, acronyms, and needless words. Before submission, contributors must review their manuscripts with (i) computer grammar and spelling tools/filters and (ii) a colleague who is expert in English language grammar and syntax. Manuscripts may be returned without review or rejected on the basis of poor English or accepted standards of style. Check to ensure that all listed references, figures, and tables are cited in the text and that all cited references, figures, and tables are presented in appropriate sections. The Editor reserves the right to make changes to improve the clarity of the text. All such changes will be subject to contributors' approval before publication.

Revised Manuscripts

All revisions must be accompanied by a cover letter signed by all authors to the Editor. The letter must (i) detail on a point-by-point basis the contributors' disposition of each of the referees' comments, and (ii) certify that all contributors approve of the revised content and that the manuscript complies with stipulations 'i' through 'iv' in "General Policy". Responses to separate reviewers should be on separate pages. Also include a copy of the revision with all changes highlighted.

RANDOMIZED CLINICAL TRIALS

Effective January 2004, manuscripts reporting a randomized clinical trial should follow the CONSORT guidelines as published in the *Annals of Internal Medicine* (*Ann Int Med* 134:657-662, 2001). Click [here](#) to download the checklist. This completed checklist file should be uploaded as Supplemental Material.

The *Journal* encourages authors to register their clinical trials in a public trials registry, and we ask authors of manuscripts describing such studies to submit the name of the registry and the study registration number prior to publication. The International Committee of Medical Journal Editors plans to consider clinical trials for publication only if they have been registered (see *N Engl J Med* 2004;351:1250-1 - <http://content.nejm.org/cgi/content/full/351/12/1250>). The following registries meet these requirements: <http://prsinfo.clinicaltrials.gov> and <http://controlled-trials.com/isrctn/submission/>.

GENE DATA

Prior to submission, the *Journal* asks that novel gene sequences be deposited in a public database (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/submit.html>, EMBL, <http://www.ebi.ac.uk/embl/Submission/index.html>, or DDBJ

<http://www.ddbj.nig.ac.jp/sub-e.html>), and the accession number provided to the JDR. Manuscript submissions including microarray data should (a) include the information recommended by the MIAME <http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html> guidelines in their submission, and/or (b) identify the submission details for the experimental details to one of the publicly available databases (ArrayExpress <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/> or GEO <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

MANUSCRIPT COMPONENTS

The components of a manuscript should be: 1) title page, 2) abstract, 3) introduction, 4) materials and methods, 5) results, 6) discussion, 7) acknowledgments, 8) references, 9) tables, and 10) figure legends. The complete manuscript should be arranged in that order. Number all pages consecutively in the top right-hand corner, including the title page. Label figures clearly. Each figure label must indicate the number corresponding to the citation in the text, an arrow indicating the top, and contributors' abbreviated names.

1) Title Page (page 1)

Type in bold type with only the first letters of the main words capitalized. The title should be brief (not to exceed 60 characters) and illustrative of the key finding. Also type the contributors' initials and last names in upper- and lower-case letters. Use superscript numbers to relate contributors to different departments or institutions, or to indicate a change in address. For the corresponding author who will receive reprint requests, provide the full postal (including ZIP or Postal Code) and e-mail addresses, telephone and FAX numbers, as available. If the corresponding author is not the first author, indicate by a number superscript, and use the phrase "corresponding author", and that individual's e-mail address. The following information must be included on the cover page: 1) a short title (running head) of up to 45 characters; 2) three to five key words; 3) the number of words in the abstract; 4) the number of words in the abstract and the text (excluding tables, figure legends, acknowledgments, and cited references); 5) the number of tables and figures; and 6) the number of cited references. If applicable, include source footnotes on page 1 to indicate prior preliminary publication. For example, state that the work was "Based on a thesis submitted to the graduate faculty, Azimuth University, in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree" or that a preliminary report was presented at, or published in... Report all sources of funding in a later section, "Acknowledgments".

2) Abstract (page 2)

A self-standing summary of the text, this section should not exceed one typed page (about 150 words). Concisely describe the (i) background and rationale, (ii) hypothesis or study objective, (iii) design and key methods, (iv) essential results, and (v) conclusions. Avoid abbreviations. The abstract will be re-published separately by information retrieval services.

3) Introduction (page 3)

Briefly and clearly describe the background and rationale for the stated hypothesis to be tested or objective to be studied. Sufficient detail must be provided to permit the interdisciplinary reader to evaluate the results without review of earlier publications. Describe and cite only the most relevant earlier studies; avoid presentation of an exhaustive review of the field. Do not include a summary of the results presented in the manuscript.

4) Materials & Methods

To provide sufficient technical information so that the experiments can be repeated, the (i) experimental or study design, (ii) specific procedures, and (iii) type of statistical analysis must be described clearly and carefully. Use section subheadings in a logical order to title each category or method. Previously published methods should be named (e.g., "ultrasonic treatment" rather than mention of the cited contributors' names) and cited. New methods must be described completely. Present the data that validate the new method. A method used for only part of one experiment may be described briefly in the "Results" section, table footnote, or figure legend. Present descriptive information about large numbers of experimental reagents, microbes, test materials, primer sequences, in tabular form with a brief explanation in the text. Proprietary names and sources of supply of all commercial products must be given in parentheses in the text (name and model of product, company, city, and state or country). Report generic names and terms wherever possible. For protocols involving the use of human subjects or specimens, indicate succinctly that subjects' rights have been protected by an appropriate institutional review board and informed consent was granted. When laboratory animals are used, indicate the level of institutional review and assurance that the protocol ensures humane practices.

5) Results

This section serves only to introduce data in the (i) text, (ii) tables, and (iii) figures and to call attention to their significant parts. Report results concisely, using tables and figures to present important differences or similarities that cannot otherwise be presented or summarized in the text. The rationale and design of experiments should be made clear in the previous sections of the manuscript. Reserve subjective comments, interpretation, or reference to the previous literature for the "DISCUSSION". Number tables and figures in the order in which they are described and cited in the text. All tabular data should identify and report (i) either standard deviation values or standard errors of the means, (ii) the number of replicate determinations or human or animal subjects, and (iii) probability values and name(s) of statistical test(s) for reported differences. Restrict presentation of photo- and electron micrographs to those essential to the results. If essential to the results, color can be published at the discretion of the Editor. (The cost for color in reprints, however, must be borne by the author. For cost estimates, contact the Global Headquarters at 703-548-0066, or FAX 703-548-1883, e-mail publications@iadr.org.)

6) Discussion

Explain and interpret the results with a scientifically critical view of the previously published work in the field. Highlight the advances made by the new data. Indicate

the limitations of the findings. State the conclusions of the report, and explain why they are merited by the data. This is the only proper section for subjective comments.

7) Acknowledgments

Recognize individuals who provided assistance to the project. Report all sources of grant and other support for the project or study, including funds received from contributors' institutions and commercial sources, and do not refer to a study being only partially funded by the cited sources. Consultancies and funds paid directly to investigators must also be listed, with statements such as "This investigation was supported in part by USPHS Research Grant DE-0000-00 from the National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892".

8) References (maximum, 35)

This section will list all sources cited in the paper. Arrange the citations in alphabetical order by last name of the first author without numbering. When citing a reference in the text, provide attribution for the subject under discussion. For example, "Cold fusion has been difficult to replicate (Williams and Jones, 1988), but some recent modifications in experimental design (Jones et al., 1989) continue to stimulate new investigation." Avoid "Jones et al. (1989) found..." or "In a recent study, Jones (1990) found...", which creates vague statements because the subject is shifted from "cold fusion" to the names of the cited contributors. Use "et al." (in italics) when the cited work is by three or more contributors. When the cited work is by two contributors, use both surnames separated by "and". When citing multiple references by the same author(s) in the same year, use "a", "b", etc. (e.g., Jones, 1980b). Multiple references should be listed in chronological order of publication, separated by semi-colons. "Unpublished observations" and "personal communications" may be inserted into and cited (in parentheses) in the text with written permission from the correspondents, but are not to be used as references. Abbreviate journal names according to the style used in Index Medicus. Other titles should be formatted with slight modifications of the style used by the US National Library of Medicine in Index Medicus. Examples of reference citation formats are illustrated below. Avoid using abstracts as references. Data from abstracts should be referenced as "personal communication" or "unpublished observations" as appropriate. When citing a Web site, list the authors and title if known, then the URL and the date it was accessed (in parentheses). Include among the references papers accepted but not yet published; designate the journal and add "(in press)". Information from manuscripts submitted but not yet accepted should be cited in the text as "unpublished observations" (in parentheses). The references must be verified by the author(s) against the original documents and checked for correspondence between references cited in the text and listed in the "References" section.

Examples of correct forms of references are listed below. They are single-spaced here for illustration but should be double-spaced in the manuscript.

ARTICLES IN JOURNALS

1. Standard journal article

(List all authors, but if the number exceeds six, give six authors' names followed by *et al.*) West DJ, Snaveley DB, Zajac BA, Brown GW, Babb CJ (1990). Development and persistence of antibody in a high-risk institutionalized population given plasma-derived hepatitis B vaccine. *Vaccine* 8:111-114.

2. Organization as author

The Royal Marsden Hospital Bone-Marrow Transplantation Team (1977). Failure of syngeneic bone-marrow graft without preconditioning in post-hepatitis marrow aplasia. *Lancet* 2:742-744.

3. No author given Coffee drinking and cancer of the pancreas (editorial) (1981). *Br Med J* 283:628.

4. Article in a foreign language

Massone L, Borghi S, Pestarino A, Picini R, Gambini C (1987). Localisations palmaires purpuriques de la dermatite herpétiforme. *Ann Dermatol Venereol* 114:1545-1547.

5. Volume with supplement

Magni F, Rossoni G, Berti F (1988). BN-52021 protects guinea pig from heart anaphylaxis. *Pharmacol Res Commun* 20(Suppl 5):75-78.

6. Issue with supplement

Gardos G, Cole JO, Haskell D, Marby D, Paine SS, Moore P (1988). The natural history of tardive dyskinesia. *J Clin Psychopharmacol* 8(4 Suppl):31S-37S.

7. Volume with part

Hanly C (1988). Metaphysics and innateness: a psychoanalytic perspective. *Int J Psychoanal* 69(Pt 3):389-399.

8. Issue with part

Edwards L, Meyskens F, Levine N (1989). Effect of oral isotretinoin on dysplastic nevi. *J Am Acad Dermatol* 20(2 Pt 1):257-260.

9. Issue with no volume

Baumeister AA (1978). Origins and control of stereotyped movements. *Monogr Am Assoc Ment Defic* (3):353-384.

10. No issue or volume

Danoek K (1982). Skiing in and through the history of medicine. *Nord Medicinhist Arsb*:86-100.

11. Pagination in Roman numerals

Ronne Y (1989). Ansvarsfall. Blodtransfusion till fel patient. *Vardfacket* 13:XXVI-XXVII.

12. Type of article indicated as needed

Spargo PM, Manners JM (1989). DDAVP and open heart surgery (letter). *Anaesthesia* 44:363-364. Fuhrman SA, Joiner KA (1987). Binding of the third component of complement C3 by *Toxoplasma gondii* (abstract). *Clin Res* 35:475A.

13. Article containing retraction

Shishido A (1980). Retraction notice: Effect of platinum compounds on murine lymphocyte mitogenesis (Retraction of Alsabti EA, Ghalib ON, Salem MH. In: *Jpn J Med Sci Biol* 1979; 32:53-65). *Jpn J Med Sci Biol* 33:235-237.

14. Article retracted

Alsabti EA, Ghalib ON, Salem MH (1979). Effect of platinum compounds on murine lymphocyte mitogenesis (Retracted by Shishido A. In: *Jpn J Med Sci Biol* 33:235-237, 1980). *Jpn J Med Sci Biol* 32:53-65.

15. Article containing comment

Piccoli A, Bossatti A (1989). Early steroid therapy in IgA neuropathy: still an open question (comment). *Nephron* 51:289-291. Comment on: *Nephron* 51:289-291, 1989.

16. Article commented on

Kobayashi Y, Fujii K, Hiki Y, Tateno S, Kurokawa A, Kamiyama M (1988). Steroid therapy in IgA nephropathy: a retrospective study in heavy proteinuric cases (see comments). *Nephron* 48:12-17. Comment in: *Nephron* 51:289-291, 1989.

17. Article with published erratum

Schofield A (1988). The CAGE questionnaire and psychological health (published erratum appears in *Br J Addict* 84:701, 1989). *Br J Addict* 83:761-764.

BOOKS AND OTHER MONOGRAPHS

18. Authored

Colson JH, Armour WJ (1986). Sports injuries and their treatment. 2nd rev. ed. London: Butterworth Heinemann.

19. Editor(s), compiler as author

Diener HC, Wilkinson M, editors (1988). Drug-induced headache. New York: Springer-Verlag.

20. Organization as author and publisher

Virginia Law Foundation (1987). The medical and legal implications of AIDS. Charlottesville, VA: The Foundation.

21. Chapters in a book

Weinstein L, Swartz MN (1974). Pathologic properties of invading microorganisms. In: Pathologic physiology: mechanisms of disease. Sodeman WA Jr, Sodeman WA, editors. Philadelphia: Saunders, pp. 457-472.

22. Conference Proceedings

Vivian VL, editor (1985). Child abuse and neglect: a medical community response. Proceedings of the First AMA National Conference on Child Abuse and Neglect, Mar 30-31, 1984, Chicago. Chicago, IL: American Medical Association.

23. Conference Paper

Harley NH (1985). Comparing radon daughter dosimetric and risk models. In: Indoor air and human health. Proceedings of the Seventh Life Sciences Symposium, Oct 29-31, 1984, Knoxville, TN. Gammage RB, Kaye SV, editors. Chelsea, MI: Lewis Publishers, pp. 69-78.

24. Scientific and technical report

Akutsu T (1974). Total heart replacement device. Apr. Report No.: NIH-NHLI-69-2185-4. Bethesda, MD: National Heart and Lung Institute of the National Institutes of Health.

25. Dissertation

Youssef NM (1988). School adjustment of children with congenital heart disease (dissertation). Pittsburgh, PA: Univ. of Pittsburgh.

26. Patent

Harred JF, Knight AR, McIntyre JS, inventors (1972). Dow Chemical Company, assignee. Epoxidation process. US patent 3,654,317. Apr 4.

OTHER PUBLISHED MATERIAL

27. Newspaper article

Rensberger B, Specter B (1989). CFCs may be destroyed by natural process. *The Washington Post* Aug 7, Sect. A2, col. 5.

28. Audiovisual

AIDS epidemic: the physician's role (videorecording) (1987). Cleveland, OH: Academy of Medicine of Cleveland.

29. Computer file

Renal system (computer program) (1988). MS-DOS version. Edwardsville, KS: Medi-Sim.

30. Legal material

Toxic Substances Control Act: Hearing on S. 776 Before the Subcomm. on the Environment of the Senate Comm. on Commerce. 94th Cong., 1st Sess. 343 (1975).

31. Map

Scotland (topographic map) (1981). Washington: National Geographic Society .

32. Book of the Bible

Ruth 3:1-18. The Holy Bible. Authorized King James version (1972 ed.). New York: Oxford Univ. Press.

33. Dictionary and similar references

Ectasia. Dorland's illustrated medical dictionary. 27th ed. (1988). Philadelphia: Saunders, p. 527.

34. Classical material

The Winter's Tale: act 5, scene 1, lines 13-16. The complete works of William Shakespeare (1973). London: Rex.

UNPUBLISHED MATERIAL

35. In press

Lillywhite HB, Donald JA (1993). Pulmonary blood flow regulation in an aquatic snake. *Science* (in press).

9) Tables and 10) Figures (maximum, four total)

9) Tables

Type one table per page. In the order of mention in the text, number each table consecutively with Arabic numerals in the heading. In the heading, follow the table number with a brief descriptive title, generally highlighting the key result. Design tables to highlight key results and comparisons. Make every effort to make the presentation of data clear, simple, and uncluttered. As column headings, use accurate descriptors instead of symbols, acronyms, and abbreviations. To avoid overlong titles and cumbersome tables, use explanatory footnotes whenever possible. In the table or title, indicate the order of footnotes with superscript a,b,c,d,e,f, ... If needed in footnotes, cite the short form of references in parentheses. In tabular columns and the text, decimals less than unity must have the decimal point preceded by a zero. To ensure that the presentation is clear, report only the number of significant digits appropriate to the sensitivity and discrimination of the measure and the differences to be illustrated. Column headings should be simple and clear so that tables will be understandable without consultation of the text. Generally, column headings identify dependent variables, while independent variables are identified by row descriptors on the left. Tables will usually be printed either 3-1/4 or 7 inches wide.

10) Figures

Figures are illustrative materials, including photomicrographs, radiographs, charts, and graphs. Digitized figures must be certified by the contributors to be an accurate representation of the original data and not electronically edited. Figures must be discussed thoroughly in the text. Authors should present their figures as black & white images unless they specifically confirm that they are willing to fund color reproduction. Rates for color reproduction are \$300 per initial page of color and \$150 for each additional page of color. Authors wishing to pay to publish color figures should declare so in their cover letter or contact the Publications Department at the Global Headquarters, at 703-548-0066, e-mail publications@iadr.org. Figures will generally be printed column-width, 1-1/2 columns' width, or page-width. Extraneous

material should be cropped out to ensure minimal reduction. If crop marks are necessary, do not place them directly on the figure. Mount the figure on a sheet of paper and place the crop marks on the paper. Photomicrographs must include a scale of the form |_____|, clearly labeled with a convenient unit of length, e.g., 50 μ m. Graphs should be labeled briefly and clearly at the abscissa and ordinate, including the units of measure. All figures must be labeled to allow for easy readability and visualization if reduced by 50% or more. If possible, determine the percentage reduction at which the figure will be reproduced (e.g., 3-1/4 or 7 inches wide). Print a copy at that percentage to see how all elements will be affected. Consider that any line or rule thinner than 1/2 point may not reproduce. Patterns used in bar charts can become illegible, thus rendering useless any keys provided for graphs. Ideally, all figures should be provided at the optimum size for publication. The title and other identification may appear in the legend.

Legends

Legends for all figures, including charts and graphs, must be typed together on a separate page and should be understandable without reference to the text. Include a title highlighting the key result and a key for any symbols or abbreviations used in the figure.

AUTHORITATIVE REFERENCES

The Random House Dictionary of the English Language (Unabridged) will be used as the authority for spelling of non-medical terms. Where two plural forms are provided, the American English form will be used. For anatomical nomenclature, *Nomina Anatomica* (5th ed.) and *Dorland's Illustrated Dictionary* will be considered authoritative.

NOMENCLATURE

Authors should refer to the *International System of Units* (SI), D.T. Goldman and R.J. Bell, Eds., NBS Special Publication 330 (1981). This booklet is available from the US Dept. of Commerce, National Institute of Standards and Technology, Washington, DC 20234. Use of correct symbols includes m for milli-, μ for micro-, and L for liter (as in mL, L, etc.). Express grams as g, hours as hr, seconds as sec, and centrifugal force as g (e.g., 10,000 g). Use nm rather than Angstroms. Concentrations should be expressed as mol/L or mmol/L, etc. Insert leading zeros in all numbers less than 1.0 in the text, tables, and figures.

Numbers of ten and fewer should be written out (e.g., ten subjects), except when indicating inanimate quantities (e.g., 10 mL), and numbers that are greater than ten should appear as digits. Always use digits to express dates, dimensions, degrees, doses, periods of time, percentages, proportions, ratios, sums of money, statistical results, weights, and measures, or to enumerate animals (but not people), culture cells and organisms, organs, and teeth. Leave a space between numbers and their accompanying units (e.g., 10 mg, not 10mg), and around the = and signs.

Micro-organisms should be referred to in accordance with the International Rules of Nomenclature. When applicable, the nomenclature for bacteria presented in *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology* (current edition) will be followed. The first reference

to an organism by genus and species must be in full (*e.g.*, *Lactobacillus casei*); subsequent mention may abbreviate genus (*L. casei*). When a common name of a bacterium or group is mentioned, do not italicize (*e.g.*, "some lactobacilli" or "sanguis group streptococci").

Authors of papers containing primary nucleotide sequencing data are expected to deposit this information in an appropriate database (*e.g.*, GenBank/EMBL). Pertinent accession numbers should be provided with the submitted manuscript. Published articles will include a footnote indicating the accession number and database in which the information was deposited.

For examples of format not specified here, contributors should consult the Council of Biology Editors Style Manual (current edition) and current issues of the Journal.

The complete names of individual teeth must be given in full in the text of articles (*e.g.*, "permanent upper right first premolar"). In Tables, these names may be abbreviated by Viohl's Two-digit System. As approved by the International Standards Organization, the first digit indicates the quadrant and the second digit the type of tooth within the quadrant. Starting at the upper right side and rotating clockwise, quadrants are assigned the digits 1 to 4 for the permanent and 5 to 8 for the deciduous teeth; within the same quadrant, teeth from the midline backward are assigned the digits 1 to 8 (deciduous teeth, 1 to 5). For example, the permanent lower right first molar is designated '46' and the deciduous upper left canine, '63'.