



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araçatuba



LUIZA MONZOLI CÔVRE

**USO DA MISTURA DE α E β -AMIRINA COMO MEIO DE
CONSERVAÇÃO EM REIMPLANTE DENTÁRIO.**

Araçatuba

2019



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araçatuba



LUIZA MONZOLI CÔVRE

**USO DA MISTURA DE α E β -AMIRINA COMO MEIO DE
CONSERVAÇÃO EM REIMPLANTE DENTÁRIO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Odontologia, área de Clínica Integrada.

Orientadora: Profa. Ass. Dra. Daniela Atili Brandini de Weert.

Araçatuba

2019

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

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

Black D2
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

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

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus.

Meu protetor, meu guia e meu refúgio, esteve sempre comigo no decorrer da minha vida, atendendo as minhas preces e orações, guiando minhas escolhas e iluminando meus caminhos. Nos momentos de fraqueza e aflição, Ele sempre me deu forças para continuar e mostrou seu amor incondicional para conosco. Sem o Senhor, meu Deus, nada disso seria possível. Obrigada por sempre cuidar tão bem de mim!

Aos meus pais.

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

cuidado e sacrifícios que vocês fizeram para que eu conseguisse alcançar meus sonhos. Não vejo a hora de estarmos juntos para comemorar. Amo vocês!

Ao meu irmão,

André Monzoli Côvre, meu parceiro desde pequena, ele sempre foi minha referência e espelho, o admirava e queria ser igual a ele, dedicado, inteligente e esforçado. Você sempre me inspirou e me ensinou a importância dos estudos. Quem diria que um dia chegaríamos tão longe? Obrigada pelo carinho, amor, pelo apoio e por viver tudo isso comigo. Sempre vibramos e ficamos muito felizes com as conquistas um do outro. É muito bom saber que aconteça o que acontecer, sempre teremos um ao outro, sempre juntos, nas dificuldades e alegrias. Dedé, você também faz parte dessa conquista, amo você!

A toda a minha família,

Meus avós, tios e primos, que sempre me incentivaram e vibraram comigo as minhas conquistas. A família é a nossa maior riqueza, sou muito feliz e grata por terem vocês comigo, obrigada por todo carinho e ajuda em toda essa caminhada.

Ao meu namorado,

Luiz Henrique Soares Torres, meu amor, meu companheiro e meu ponto de paz. Esteve junto comigo em toda essa etapa. Você que mesmo distante, sempre se fez presente. Acompanhou todos os momentos, me deu apoio quando estive triste e com dificuldades e vibrou junto comigo as vitórias e conquistas. Obrigada pela paciência quando as coisas estavam difíceis e não podia dar atenção devida ou quando eu tinha minhas oscilações de humor e crises existenciais. Obrigada por sempre me ouvir e incentivar a correr atrás dos meus sonhos e objetivos. Você é incrível, que bom que tenho você comigo, é maravilhoso poder compartilhar a vida

com você e podermos crescer juntos. Sem você essa caminhada teria sido muito mais difícil. Obrigada por sempre estar ao meu lado. Amo você!

Aos amigos,

Déborah Magalhães Aguiar, Thamires Rodrigues Martins, Yasmim dos Reis Natalino, Kamila Vieira Moraes e Jéssica Delazari Ferreira, amigas que a UFES me deu, elas foram responsáveis por meus melhores momentos em Vitória. Depois de 2017, quando nos formamos, cada uma seguiu caminhos diferentes e a distância física nos separa, mas o importante é que sabemos que nada disso muda a nossa amizade. Quero vocês para sempre comigo. Vocês fazem muita falta no meu dia a dia e não vejo a hora de nos encontrarmos para matar a saudade! Obrigada pelo incentivo e apoio que me deram desde quando decidi que iria fazer a prova do mestrado e pela alegria compartilhada quando dei a notícia de que havia sido aprovada. Dividir tudo isso com vocês foi muito especial.

Joyce Terassaka Dias, amiga que Araçatuba me deu. Foi minha companheira de apartamento durante um ano. Adorava saber sobre a minha pesquisa e o que estávamos estudando, sempre me apoiando e incentivando nessa caminhada. Joyce, obrigada por sua amizade, pelos momentos compartilhados, por se preocupar comigo e pela sua companhia maravilhosa. Você é muito importante para mim e a quero sempre na minha vida.

Aos amigos da Foa/Unesp,

Laís Sara Egas, meu melhor presente da FOA, imagina a minha alegria quando me disseram que tinha outra baiana na Pós-Graduação, logo quis conhecê-la e não deu outra, nos demos bem logo de cara e eu ganhei uma amiga para a vida. O que seria de mim sem você aqui? Virou minha companheira para todos os momentos, aquela que eu sei que posso contar sempre. Obrigada por todo apoio, ajuda,

incentivo, amizade e por tantos momentos compartilhados. Você é uma pessoa linda por dentro e por fora, iluminada, que espalha alegria por onde passa. Lai, você merece tudo de mais maravilhoso nessa vida. Obrigada por tudo!

Letícia Cerri Mazza, dona de um coração enorme. Ela foi a primeira pessoa que me ajudou logo que cheguei a Araçatuba, nunca vou esquecer que sem mesmo me conhecer, ela me acolheu em sua casa, para não me deixar pagando hotel. Também foi minha companheira de apartamento durante um ano, tornando o nosso dia a dia muito mais divertido. Sempre se preocupava comigo, se eu estava me alimentado direito e se estava bem. Ela é dona de uma alegria ímpar, sempre nos divertia com suas histórias. Le, ter você comigo foi essencial para minha adaptação à cidade e a pós-graduação, você fez meu ano ser muito mais leve e divertido. Você e a Rey fazem muita falta. Conte comigo sempre para o que precisar. Obrigada por tudo!

Aos amigos da Clínica Integrada.

Caio Vinicius Lourenço Debortoli e Marina Fuzette Amaral, pessoas muito importantes para mim, meus companheiros de Pós-Graduação e de grupo de pesquisa, aprendo tanto com vocês. Lembro-me no começo, eu recém-chegada a FOA, não conhecia nada, ficava perdida dentro do departamento e laboratório, foram vocês que em ensinaram e ajudaram em tudo. É ótimo compartilhar essa caminhada com vocês. Obrigada por todo apoio e ajuda. Ter vocês aqui comigo foi essencial, muito obrigada!

Leonardo Raniel Figueiredo e Heitor Pinhata Cecílio, meus companheiros de mestrado, entramos juntos na Pós-graduação e não poderiam ter melhores pessoas para estarem comigo nessa jornada. Vocês tornaram essa caminhada muito mais leve, até as sextas à noite na clínica com vocês se tornavam mais legais. Pessoas maravilhosas que estavam sempre dispostos a me ajudar quando precisei. Obrigada por compartilharem tudo isso comigo!

Ana Paula Veloso de Linhares, minha companheira de Integrada e de apartamento. Chegou esse ano na Pós-graduação e já é muito especial para mim. Dividir o dia a dia e essa jornada com você é ótimo. Obrigada pelo companheirismo, pela ajuda, companhia e pelos momentos de descontração. Conte comigo sempre, para o que precisar!

Caio, Marina, Leo, Heitor e Ana, vocês foram essenciais para que essa etapa se concretizasse. Vocês tornaram tudo muito mais leve e divertido, sem vocês esse caminho seria muito mais difícil. Obrigada também pelas inúmeras caronas que todos me deram, sempre me ajudaram. Sou muito grata a Deus por ter encontrado pessoas tão maravilhosas. Quero vocês comigo para sempre, obrigada por tudo!

À minha orientadora,

Daniela Atili Brandini de Weert, um exemplo de pessoa e profissional. Dona de um coração enorme e de um sorriso contagiante. Me recebeu de braços abertos como sua orientada e me fez sentir acolhida desde o começo. Sem dúvidas ter você como minha orientadora foi um presente. Lembro que alguns dias antes de me mudar para Araçatuba, eu estava insegura e com medo de como tudo seria, e desde o primeiro contato com você, tudo isso passou num segundo, naquele momento tive a certeza que esse caminho seria riquíssimo e que tudo valeria a pena. Obrigada por depositar sua confiança e acreditar em mim. Obrigada também por tantos ensinamentos, muitas vezes nem sempre acadêmicos, pelo cuidado, carinho, amizade e preocupação comigo. Me inspiro muito em você, sua dedicação e amor pela profissão são lindos, se um dia eu for 10% da profissional que você é, estarei extremamente feliz. Muito obrigada por tudo professora!

Aos professores da Clínica Integrada,

Celso Koogi Sonoda, Denise Pedrini, Aline Takamiya e Wilson Roberto Poi, pessoas e profissionais maravilhosos. Agradeço por me acolherem tão bem na Clínica Integrada. Obrigada por todo conhecimento e ensinamento ao longo desses dois anos. Vocês são exemplos que levarei para a toda minha carreira.

AGRADECIMENTOS

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

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia UNESP – Araçatuba, **Prof. Dr. André Luiz Fraga Briso** pelo acolhimento para o desenvolvimento deste trabalho.

As funcionárias da secretaria de Pós-graduação, **Valéria, Cristiane e Lilian** pela atenção, disponibilidade, paciência e simpatia concedida durante todas as etapas do mestrado.

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

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, **Paulo, Renato e Marco**. Muito obrigada por toda ajuda, atenção, disponibilidade e pelos bons papos durante os momentos de pausa para tomar o melhor café da FOA.

Ao departamento de Ciências Básicas, principalmente em nome do **Prof. Dr. Cláudio Casatti** e do doutorando **Gestter Tessarin**, pelo suporte, ensinamentos e ajuda para a realização desse projeto.

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

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

Aos alunos de graduação, em especial ao **Vitor Hugo Sampaio**, pela sua amizade, ajuda e companheirismo.

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

*"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou
o que deveria ser, mas já não sou o que era
antes."*

(Martin Luther King)

Côvre LM. Uso da mistura de α e β -amirina como meio de conservação em reimplante dentário. [Dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2019.

RESUMO

A avulsão dentária é considerada o tipo mais grave de trauma dentário, sendo o reimplante considerado o seu melhor tratamento. O controle da inflamação durante o processo de reparo periodontal é de extrema importância, visando impedir a ocorrência da reabsorção radicular no dente reimplantado. A resina extraída da árvore *Protium heptaphyllum* recebe destaque por suas propriedades anti-inflamatórias, tendo como principais componentes a α e β -amirina. O objetivo deste estudo foi avaliar o processo de reparo do ligamento periodontal de dentes de ratos reimplantados, utilizando a mistura de α e β -amirina como meio de conservação. Foram utilizados 36 ratos machos, divididos em 3 grupos. Foi extraído o incisivo central superior direito de todos os ratos, deixado no respectivo meio de conservação e depois reimplantado. A divisão dos grupos foi realizada de acordo com o meio de conservação utilizado por um período de 20 minutos, após o dente permanecer 20 minutos em meio seco, sendo: Grupo SO – soro fisiológico 0,9%; Grupo AMSC - solução de α e β -amirina a 10% diluída em tween 80, sem tratamento de canal; e Grupo AMCC - solução de α e β -amirina a 10% diluída em tween 80, com tratamento de canal. Após 60 dias foi realizada a eutanásia dos ratos através de perfusão transcardíaca e posterior processamento histológico. Os cortes obtidos foram corados em Hematoxilina e Eosina e Picrosirius Red para estudo histomorfométrico em microscopia de luz e polarização, respectivamente. Foi avaliada a área de fibras colágenas, matriz extracelular e vasos sanguíneos, número de perfil nuclear, organização do ligamento periodontal, extensão e intensidade do processo inflamatório, reabsorção dentária e anquilose. Os testes Kruskal-Wallis e post-hoc de Bonferroni foram utilizados para a comparação entre os grupos ($\alpha=0,05$). Dentre as diferenças significativas observou-se: O terço apical da raiz no grupo AMCC apresentou maior porcentagem de área de vasos sanguíneos em comparação ao grupo SO. O mesmo também apresentou na análise das fibras colágenas, menor área de fibras Tipo I e maior área de fibras Tipo III, em contrapartida o grupo AMSC apresentou a maior área de fibras tipo I e menor de

fibras tipo III. As outras variáveis foram semelhantes entre os três grupos. Conclui-se que a mistura de α e β -amirina possui potencial para utilização como meio de conservação em avulsão dentária, no entanto necessita de mais estudos em outras concentrações e meio de diluição para utilização tópica.

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

Côvre LM. Use of α and β -amirine mixture as a preservative in dental replantation. [Dissertation] – Araçatuba: UNESP – São Paulo State University; 2019.

ABSTRACT

Tooth avulsion is considered the most severe type of dental trauma, and replantation is considered its best treatment. Inflammation control during the periodontal repair process is extremely important, aiming to prevent the occurrence of root resorption in the reimplanted tooth. The resin extracted from the *Protium heptaphyllum* tree is highlighted for its anti-inflammatory properties, having as main components α and β -amirine. The aim of this study was to evaluate the periodontal ligament repair process of reimplanted rat teeth, using the α and β -amirine mixture as a preservative. Thirty six male rats were divided into 3 groups. The right upper central incisor was extracted from all rats, left in their preservation medium and then reimplanted. The groups were divided according to the preservation medium used for a period of 20 minutes, after the tooth remained 20 minutes in a dry medium, as follows: Group SO - saline 0.9%; AMSC Group - 10% α and β -amirine solution diluted in tween 80, without root canal treatment; and AMCC Group - 10% α and β -amirine solution diluted in tween 80, with root canal treatment. After 60 days the rats were euthanized by transcardiac perfusion and subsequent histological processing. The obtained sections were stained in Hematoxylin and Eosin and Picrosirius Red for histomorphometric study in light and polarization microscopy, respectively. Collagen fibers area, extracellular matrix and blood vessels, number of nuclear profile, periodontal ligament organization, extent and intensity of inflammatory process, bone and dental resorption and ankylosis were evaluated. Kruskal-Wallis and Bonferoni post-hoc tests were used for comparison between groups ($\alpha = 0.05$). Among the significant differences were observed: The apical third of the root in the AMCC group presented a higher percentage of blood vessel area compared to the SO group. It also presented in the analysis of collagen fibers, the smallest area of Type I fibers and the largest area of Type III fibers, in contrast, the AMSC group presented the largest area of Type I fibers and the smallest type III fibers. The other variables were similar between the three groups. It is concluded that the mixture of α and β -amirine has potential for use as a storage medium for dental avulsion, however further studies are required at other concentrations and dilution medium for topical use.

Key-words: Tooth injuries. Tooth avulsion. Tooth replantation. Burseraceae.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Análise estatística dos eventos histomorfométricos associado ao ligamento periodontal corados pela técnica H.E. nos grupos experimentais pelo teste Kruskal-Wallis com teste post-hoc de Bonferroni com 5% nível de significância. Todos os dados estão expressos em média.	34
Tabela 2 -	Análise estatística dos eventos histomorfométricos associado ao ligamento periodontal corados pela técnica Picrosirius Red nos grupos experimentais pelo teste Kruskal-Wallis com teste post-hoc de Bonferroni com 5% nível de significância. Todos os dados estão expressos em média.	34
Tabela 3 -	Distribuição de escores e análise estatística de detalhes histomorfométricos na raiz dental e tecido ósseo pelo teste Kruskal-Wallis com teste post-hoc de Bonferroni com 5% de nível de significância. Os dados estão apresentados em percentual de eventos.	35
Tabela 4 -	Distribuição de escores e análise estatística de detalhes histomorfométricos do ligamento periodontal pelo teste Kruskal-Wallis com teste post-hoc de Bonferroni com 5% de nível de significância. Os dados estão apresentados em percentual de eventos.	36

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Cortes longitudinais do ligamento periodontal da face palatina do ICSD corados em H.E., sob microscopia de luz. Objetiva de 40x. 37
- Figura 2 - Cortes longitudinais do ligamento periodontal da face palatina do ICSD corados em Picrosirius Red, em microscopia de luz polarizada. Objetiva de 20x. 38

LISTA DE SIGLAS

µm - Micrometro.

°C - Grau Celsius.

AMCC – Grupo Mistura de α e β-amirina a 1% com tratamento de canal.

AMSC – Grupo Mistura de α e β-amirina a 1% sem tratamento de canal.

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético.

H.E. - Técnica de coloração das lâminas com hematoxilina e eosina.

I.M.- Intra Muscular.

ICSD – Incisivo central superior direito.

LP - Ligamento Periodontal.

mg/Kg - Miligramas por quilo.

ml - Mililitros.

mm - Milímetro, equivalente a milésima parte do metro.

MTA - Agregado Trióxido Mineral.

PBS - Tampão fosfato de sódio.

pH - Potencial Hidrogeniônico.

SO – grupo Soro.

U.I/ml - Unidades Internacionais por mililitro.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 PROPOSIÇÃO	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Obtenção da mistura α e β -amirina extraída resina de <i>P. heptaphyllum</i> para uso tópico	25
3.2 Animais envolvidos e procedimentos realizados	25
3.3 Grupos Experimentais.....	26
3.4 Perfusão transcardíaca e processamento histológico	27
3.5 Análise histomorfométrica	28
3.6 Análise histológica qualitativa e quantitativa.....	28
3.6.1 Análise quantitativa da porcentagem de fibras colágenas, vasos sanguíneos, matriz extracelular	28
3.6.2 Análise quantitativa do número de perfis nucleares do ligamento periodontal	29
3.6.3 Análise quantitativa da largura do LP	29
3.6.4 Análise quantitativa de reabsorção radicular e anquilose dentária da raiz do ICSD	29
3.7 Análise estatística	31
4 RESULTADOS.....	32
5 DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43
ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba.....	48
ANEXO B – Normas do Periódico “Dental Traumatology”	49

1. INTRODUÇÃO

O trauma dentário pode ser definido como uma lesão proveniente de um impacto externo sobre os dentes e/ou outros tecidos duros e moles no interior e ao redor da cavidade oral. É geralmente repentino, inesperado e acidental, requerendo em alguns casos atendimento de emergência.^{1,2}

A maior prevalência de trauma dentário na população mundial envolve crianças e adolescentes, no entanto, embora essas lesões sejam mais comuns nesses determinados grupos, todos os indivíduos estão susceptíveis a uma lesão por trauma dentário, devido a suas atividades comuns diárias, assim como o aumento dos níveis de violência e do número de acidentes de trânsito, tudo isso contribuindo para que o trauma dentário se torne um problema de saúde pública emergente.^{1,3}

Dentro do trauma dentário, a avulsão é considerada o tipo mais grave, ocorre quando há o completo deslocamento do dente para fora de seu alvéolo, caracterizado pelo rompimento do feixe vâsculo-nervoso e das fibras do ligamento periodontal.^{4,5}

O reimplante é considerado o melhor tipo de tratamento para o dente avulsionado, mesmo que as condições não sejam favoráveis.⁵ A patologia dentro do reimplante envolve tanto reações pulpares quanto periodontais, a polpa e o ligamento periodontal sofrem grandes danos quando o tempo extra-alveolar é muito grande, sendo as reações de cura dependentes em maior parte desse tempo, do manuseio do dente avulsionado, grau de formação radicular, assim como do emprego ou não de um meio de conservação adequado.⁶

Desse modo, o reimplante imediato é a melhor alternativa para os casos de avulsão dentária, devido ao tempo que esse dente permaneceu fora do alvéolo, o qual é crítico para a sobrevivência das células do ligamento periodontal, uma vez que quando se consegue manter a viabilidade celular, permite-se uma maior probabilidade de reinserção das fibras e preservação do dente.^{7,8,9,10}

No entanto, o reimplante tardio ocorre com maior frequência, nesses casos o emprego de um meio de conservação adequado é de extrema importância para preservação da viabilidade celular. Várias substâncias têm sido estudadas, como a solução de balanceada de Hanks, água, saliva, soro fisiológico, leite, clara de ovo, própolis, entre outras.⁴

Atualmente, o mercado farmacêutico tem demonstrado grande interesse para pesquisas referentes ao emprego de plantas medicinais, sobretudo a aquelas utilizadas pela população, desse modo dando lugar ao desenvolvimento de novas drogas. O Brasil é um país com grande diversidade vegetal, portanto possuindo um enorme potencial para o desenvolvimento de medicamentos que aliem o conhecimento tradicional vinculado às plantas fitoterápicas e a tecnologia, possibilitando ampliar os benefícios gerados com essa substância.¹¹

A resina obtida da árvore *Protium heptaphyllum* é bastante utilizada na medicina popular e vêm sendo estudada nas áreas de farmacologia, medicina e odontologia, devido a suas propriedades anti-inflamatória, analgésica, antiplaquetária, antinoceptiva, em cicatrização de feridas, efeitos hipoglicemiantes e hipolipemiantes, atividade anticonvulsivante, efeitos ansiolíticos e antidepressivos.^{12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23}

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

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

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

Desse modo, diante do exposto, o estudo da resina de *P. heptaphyllum* e seus principais componentes, como meio de conservação no reimplante de dentes de ratos avulsionados, torna-se relevante.

2. PROPOSIÇÃO

Avaliar o processo de reparo periodontal de dentes de ratos submetidos ao reimplante após serem armazenados na mistura de α e β -amirina, extraídas da resina de *Protium heptaphyllum*, diluídas em tween 80.

3. MATERIAS E MÉTODOS

O presente estudo foi iniciado somente após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, sob número de processo 00467-2018.

3.1 Obtenção da mistura α e β -amirina extraída resina de *P. heptaphyllum* para uso tópico:

Um total de 10g da mistura da α e β -amirina na forma de pó foi obtida através de uma parceria com o Departamento de Química da Universidade Federal do Piauí, Teresina/PI, que forneceu o material para estudo. A obtenção da mistura de α e β -amirina extraídas da resina de *P. heptaphyllum* foi realizada como descrito anteriormente por Vieira-Júnior et al., 2005.²⁴ Para aplicação como meio de conservação, a mistura foi diluída em solução de Tween 80, chegando a uma solução com concentração de 10% da mistura α e β -amirina (Aphoticário Farmácia de manipulação, Araçatuba, São Paulo, Brasil).

3.2 Animais envolvidos e procedimentos realizados:

Foram utilizados 36 ratos Wistar machos, com peso corporal variando entre 200-300g. Os animais foram obtidos junto ao biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Os ratos foram acomodados em gaiolas com cinco animais cada, a uma temperatura ambiente de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, $50 \pm 10\%$ de umidade relativa do ar e ciclos de claro/escuro de 12/12 horas. Receberam água *ad libitum* e ração granulada durante todo o experimento, exceto 12 horas antes da cirurgia, em que os mesmos permaneceram em jejum.

Para execução dos procedimentos experimentais os animais receberam como relaxante muscular a xilazina (10mg/kg, Coopazine; Coopers, São Paulo, Brasil) e para a anestesia o cloridrato de quetamina (80 mg/kg, Vetanarcol; Laboratórios König, Buenos Aires, Argentina), ambas as drogas administradas por via intramuscular (I.M.). Após serem anestesiados, os animais foram posicionados na mesa operatória em decúbito dorsal, tendo os membros caudais e craniais imobilizadas de maneira que a cabeça do animal fique estável.

Posteriormente, foi realizada a antisepsia da porção anterior da maxila, com polivinilpirrolidona-iodo (Riodeine – Ind Farmac. Rioquímica Ltda), sindesmotomia,

luxação e extração do incisivo superior direito (ICSD) com auxílio de instrumental especialmente adaptado.

Os dentes extraídos tiveram a papila dentária e o órgão do esmalte seccionados com lâmina de bisturi nº15 (EMBRAMAC Exp. E Imp). Os dentes extraídos, de todos os grupos, foram armazenados em meio seco por um período de 20 minutos à temperatura ambiente e após permaneceram por mais 20 minutos imersos em um meio de conservação, de acordo com a divisão dos grupos experimentais.

Após armazenamento, os dentes extraídos do grupo AMCC tiveram a polpa removida por via retrógrada e o canal instrumentado, empregando-se lima tipo Kerr nº 25 ligeiramente curva (Kerr 25 mm, Maillefer - Dentsply). Os canais foram irrigados com soro fisiológico (Arboreto, Minas Gerais, Brasil) e secos com cones de papel absorvente (Dentsply). Depois, os canais foram preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio (Ultracal XS Kit - Ultradent) e realizado plug de MTA (Cimento reparados MTA - Angelus) nos 3mm finais do canal radicular.

Os dentes de todos os grupos foram reimplantados em seus respectivos alvéolos, com preparo prévio do mesmo, por meio de curetagem com auxílio de cureta cirúrgica e irrigados com soro fisiológico. Nenhuma contenção foi realizada.

3.3 Grupos Experimentais:

Os 36 animais, serão divididos em grupos de acordo com o meio de conservação utilizado, com 60 dias de observação cada:

- **Grupo SO:** Dentes foram extraídos e armazenados em meio seco durante 20 minutos e depois imersos em 2mL de soro fisiológico 0,9% (Arboreto, Minas Gerais, Brasil) por 20 minutos e reimplantados, sem tratamento dos canais.
- **Grupo AMSC:** Dentes foram extraídos e armazenados em meio seco durante 20 minutos e depois imersos em 2mL da mistura de α e β -amirina a 10% (Aphoticário Farmácia de manipulação, Araçatuba, São Paulo - Brasil), por 20 minutos e reimplantados, sem tratamento dos canais.
- **Grupo AMCC:** Dentes foram extraídos e armazenados em meio seco durante 20 minutos e depois imersos em 2mL da mistura de α e β -amirina a 10% (Aphoticário Farmácia de manipulação, Araçatuba, São Paulo - Brasil), por 20 minutos e reimplantados, com tratamento dos canais (Hidróxido de cálcio).

Após o reimplante, todos os animais receberam uma única dose intramuscular de 20.000 UI de penicilina G benzatina (Fontoura Wyeth S.A., São Paulo - Brasil).

3.4 Perfusão transcardíaca e processamento histológico:

A eutanásia ocorreu por meio de perfusão transcardíaca, 60 dias após o reimplante. Para isso os animais foram devidamente anestesiados e colocados em decúbito dorsal. Uma vez acessado o coração foi administrada heparina (0,1ml/5000 U.I/ml) por via intraventricular (ventrículo esquerdo). Após 10 segundos, a cânula da bomba perfusora foi colocada na artéria aorta para a perfusão com 100 ml de solução salina a 0,9%, e posteriormente 300 ml solução de paraformaldeído 4% (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) em tampão de fosfato de sódio (PBS) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) a 0,1M, pH 7,4 a 4°C.

A maxila direita foi separada da esquerda na linha mediana com o emprego de uma lâmina de bisturi nº 15 (Embramac Exp. E Imp.). Um corte com tesoura reta na porção distal do 3º molar possibilitou a obtenção da área da maxila contendo o dente reimplantado. As maxilas foram imediatamente dissecadas e colocadas em solução fixadora por 24 horas. A descalcificação das maxilas foi realizada por meio EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético) a 10% (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) em PBS.

As peças anatômicas dissecadas, após descalcificação, passaram por desidratação em soluções de alcoóis em concentrações crescentes, diafanizadas em soluções de xilol, com, e seguidamente impregnadas em parafina de baixa fusão (56-58 °C) com três trocas de parafina, de uma hora cada. Os cortes longitudinais de 4µm de espessura no sentido longitudinal foram colocados em banho-maria (40-50°C) e recolhidos em lâminas silanizadas ou revestidas de poli-L-lisina, sendo três cortes por lâmina com diferença de 40µm entre eles. Os cortes histológicos foram utilizados para a coloração no método de Hematoxilina-eosina (HE). Para coloração com Picrocirius Red, os cortes em parafina foram colocados em solução de xilol para a desparafinação, e em seguida em solução de álcool em concentrações decrescentes até água, durante meia hora, e as lâminas foram assim coradas por Picrosirius Red.

3.5 Análise Histomorfométrica:

A análise histológica foi realizada em um microscópio óptico comum (Leica – Aristoplan, Alemanha) com uma câmera digital acoplada Axiocam MRc (Axiocam MRc—Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha), para as imagens em H.E. As imagens referentes ao Picrosirius Red foram obtidas em microscópio de luz polarizada (DM4000B; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Os campos visuais das regiões analisadas de cada corte em 400x foram coletados com o software Axiovision Rel 4.0 (Carl Zeiss, GmbH, Alemanha). Foram considerados o terço médio e apical da raiz, na face palatina.

Os cortes corados com H.E. foram utilizados na avaliação das áreas de vasos sanguíneos, matriz extracelular, perfil nuclear, reabsorção radicular, espessura, organização e inflamação do ligamento periodontal e anquilose. Já os cortes submetidos ao método Picrosirius Red foram utilizados para a análise do percentual de fibras colágenas tipo I e III.

3.6 Análise histológica qualitativa e quantitativa:

Na análise quantitativa será considerada porcentagem relativa da área ocupada por fibras colágenas, vasos sanguíneos, matriz extracelular, largura do ligamento periodontal e número de perfis nucleares.

A quantificação da organização do ligamento periodontal, processo inflamatório, reabsorção radicular e anquilose foram feitas por meio de escores.

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

3.6.1 Análise quantitativa da porcentagem de área de fibras colágenas, vasos sanguíneos, matriz extracelular:

Para a análise quantitativa da área de vasos sanguíneos, fibras colágenas e matriz extracelular, as imagens foram processadas no programa de análise de imagens ImageJ (National Institutes of Health, EUA). Foram avaliadas em um aumento de 400x, na região do terço médio e apical da raiz, pela face palatina.

Para calcular a área ocupada pelos vasos sanguíneos, estas estruturas foram delimitadas, e em seguida calculadas a porcentagem em relação à área total. Para a análise quantitativa da porcentagem de matriz extracelular e fibras colágenas, foi

utilizada uma ferramenta do ImageJ que por contraste de cor nos dará a porcentagem das mesmas na região analisada.

Os tipos de fibras colágenas foram quantificados pelo programa QWin (Leica QWin V3; Leica Microsystems), selecionando quanto a coloração, sendo que as vermelhas amareladas são colágeno tipo I e as verdes amareladas, colágeno do tipo III.

3.6.2 Análise quantitativa do número de perfis nucleares do ligamento periodontal:

Para a contagem das células foi utilizada uma ferramenta do Programa ImageJ chamada de “Mult Point”, que impossibilita que uma mesma célula seja contada novamente.

3.6.3 Análise quantitativa da largura do LP:

A espessura do ligamento periodontal foi obtida por meio das médias das regiões de escolha do ICSD com o auxílio do programa ImageJ.

3.6.4 Análise quantitativa da organização e inflamação do ligamento periodontal, reabsorção radicular e anquilose dentária da raiz do ICSD:

Análises histomorfológicas

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

Eventos considerados para a análise dos resultados:

1) Raiz do dente;

1.1) Reabsorção radicular ativa e inativa;

1 - Ausência de reabsorção radicular e ou reabsorções reparadas;

2 - Áreas de reabsorção inativa (ausência de células clásticas);

3 - Pequenas áreas de reabsorções ativas;

4 - Extensas áreas de reabsorção ativa.

1.2) Extensão da reabsorção radicular. Em lâminas representativas serão feitas medidas (em micrometros) da extensão das áreas de reabsorção. A medida dos

valores obtidos por vestibular e por lingual permitirá a atribuição dos seguintes escores.

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

1.3) Profundidade de reabsorção radicular. Em lâminas representativas serão feitas medidas (em micrometros) das maiores profundidades das áreas de reabsorção. A medida dos valores obtidos permitirá a atribuição dos seguintes escores.

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

1.4) Reparo nas áreas de reabsorção radicular

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

2) Anquilose

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

3) Ligamento Periodontal:

3.1. Organização do ligamento periodontal:

- 1 - Fibras periodontais inseridas no osso e cemento em toda a extensão do ligamento;

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

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

3.2.1. Intensidade

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

3.2.2. Extensão do processo inflamatório:

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

3.7 Análise estatística:

Os dados foram analisados utilizando o programa estatístico Graph Pad Prisma 7.0 ($\alpha=0,05$). Após aplicação do teste de normalidade da amostra, o teste Kruskal-Wallis, com post-hoc de Bonferroni foi utilizado para a comparação entre os grupos.

4. RESULTADOS

No grupo SO, foram perdidos quatro animais, em dois houve fratura da raiz do ICSD no momento da exodontia durante a cirurgia experimental e nos outros dois, houve falha no corte histológico, durante a microtomia, diminuindo a amostra para 8 espécimes. Já no grupo AMCC, três animais foram perdidos, dois deles morreram durante o procedimento cirúrgico e um animal apresentou expansão alveolar, durante a exodontia do ICSD, impedindo o seu correto reimplante, ficando o grupo com 9 espécimes. No grupo AMSC, não foi perdido nenhum animal, permanecendo o grupo com 12 amostras.

A Tabela 1 apresenta os dados dos eventos histomorfométricos associado ao ligamento periodontal do ICSD, analisados através da coloração pela técnica H.E. Já a tabela 2, também apresenta os dados dos eventos histomorfométricos associado ao ligamento periodontal do ICSD, porém analisados através coloração pela técnica do Picrosirius Red. As tabelas 3 e 4 mostram, respectivamente, os dados semi-quantitativos das alterações histomorfométricas no ligamento periodontal, raiz dentária e osso alveolar.

Observando os grupos experimentais, notou-se que a espessura do ligamento periodontal, área de matriz extracelular e área de fibras colágenas apresentaram comportamentos semelhantes no terço médio e apical da raiz (Figura 1), já para os vasos sanguíneos, no terço apical, foi registrado aumento da área do grupo AMCC em relação ao grupo SO. Os perfis nucleares não tiveram alterações significativas entre os grupos (Tabela 1).

Na comparação entre os tipos de fibras colágenas, na análise do terço médio da raiz, as fibras do tipo I e III não possuem diferença entre os grupos. Em contrapartida, no terço apical houve uma diminuição significativa de fibras colágenas tipo I no grupo AMCC, assim como o aumento de fibras tipo III no mesmo grupo. Em contrapartida, o grupo AMSC apresentou maior número de fibras colágenas tipo I (Figura 2) (Tabela 2).

Quanto à reabsorção radicular, os espécimes apresentaram em sua maioria pequenas áreas de reabsorções ativas, alguns animais dos grupos SO e AMSC apresentaram áreas ativas e inativas. A maioria apresentou pouca extensão e profundidade. Todos os grupos apresentaram maiores percentuais com deposição de cemento neoformado em menos da metade das áreas reabsorvidas. Com

pequenos pontos de anquilose, em maior número em todos os grupos (Figura 1) (Tabela 3).

O ligamento periodontal apresentou organização variada entre os espécimes e grupos, desde fibras periodontais inseridas no osso e cimento em toda a extensão do ligamento a fibras inseridas em um terço da extensão, não apresentando diferença significativa. Assim como para o infiltrado inflamatório, em que houve presença de inflamação moderada em todos os grupos, com ligeira variação entre sua extensão e profundidade (Tabela 4).

Tabela 1. Análise estatística dos eventos histomorfométricos associado ao ligamento periodontal corados pela técnica H.E. nos grupos experimentais pelo teste Kruskal-Wallis com teste post-hoc de Bonferroni com 5% nível de significância. Todos os dados estão expressos em média.

GRUPOS				
Área analisada	Variável	SO	AMCC	AMSC
TERÇO MÉDIO DA RAIZ	Área de vasos sanguíneos (%)	1,75 ^A	1,44 ^A	0,70 ^A
	Área de fibras colágenas (%)	50,66 ^A	56,12 ^A	50,80 ^A
	Área de matriz extracelular (%)	47,45 ^A	42,43 ^A	48,49 ^A
	Perfil Nuclear (n)	154,68 ^A	157,88 ^A	141,45 ^A
	Espessura do Ligamento Periodontal (µm)	240,02 ^A	242,28 ^A	232,99 ^A
TERÇO APICAL DA RAIZ	Área de vasos sanguíneos (%)	0,55 ^A	2,12 ^B	1,19 ^{AB}
	Área de fibras colágenas (%)	49,03 ^A	50,01 ^A	48,01 ^A
	Área de matriz extracelular (%)	50,41 ^A	47,85 ^A	50,78 ^A
	Perfil Nuclear (n)	137,31 ^A	155,83 ^A	171,62 ^A
	Espessura do Ligamento Periodontal (µm)	229,54 ^A	232,72 ^A	220,32 ^A

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2. Análise estatística dos eventos histomorfométricos associado ao ligamento periodontal corados pela técnica Picrosirius Red nos grupos experimentais pelo teste Kruskal-Wallis com teste post-hoc de Bonferroni com 5% nível de significância. Todos os dados estão expressos em média.

GRUPOS				
Área analisada	Variável	SO	AMCC	AMSC
TERÇO MÉDIO DA RAIZ	Área de fibras colágenas tipo I (%)	68,40 ^A	59,25 ^A	66,74 ^A
	Área de fibras colágenas tipo III (%)	31,58 ^A	40,74 ^A	33,26 ^A
TERÇO APICAL DA RAIZ	Área de fibras colágenas tipo I (%)	67,69 ^A	50,91 ^B	70,39 ^A
	Área de fibras colágenas tipo III (%)	32,44 ^{AB}	46,81 ^A	29,60 ^B

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3. Distribuição de escores e análise estatística de detalhes histomorfométricos na raiz dental e tecido ósseo pelo teste Kruskal-Wallis com teste post-hoc de Bonferroni com 5% de nível de significância. Os dados estão apresentados em percentual de eventos.

Grupos			
Evento/Escore	SO (%)	AMCC (%)	AMSC (%)
Reabsorção dentária			
1	12,5	0	8,3
2	25	55,6	41,7
3	62,5	22,2	41,7
4	0	22,2	8,3
Comparação entre grupos	A	A	A
Reabsorção dentária – extensão			
1	12,5	0	8,3
2	87,5	77,8	75
3	0	22,2	16,7
4	0	0	0
Comparação entre grupos	A	A	A
Reabsorção dentária - profundidade			
1	12,5	0	8,3
2	12,5	55,6	50
3	50	11,1	8,3
4	25	33,3	33,3
Comparação entre grupos	A	A	A
Reabsorção dentária - reparo			
1	12,5	0	8,3
2	37,5	22,2	41,7
3	50	66,7	41,7
4	0	11,1	8,3
Comparação entre grupos	A	A	A
Tecido ósseo - Anquilose			
1	25	44,4	33,3
2	62,5	33,3	33,3
3	12,5	11,1	25
4	0	11,1	8,3
Comparação entre grupos	A	A	A
Número total de casos por grupo	8	9	12

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

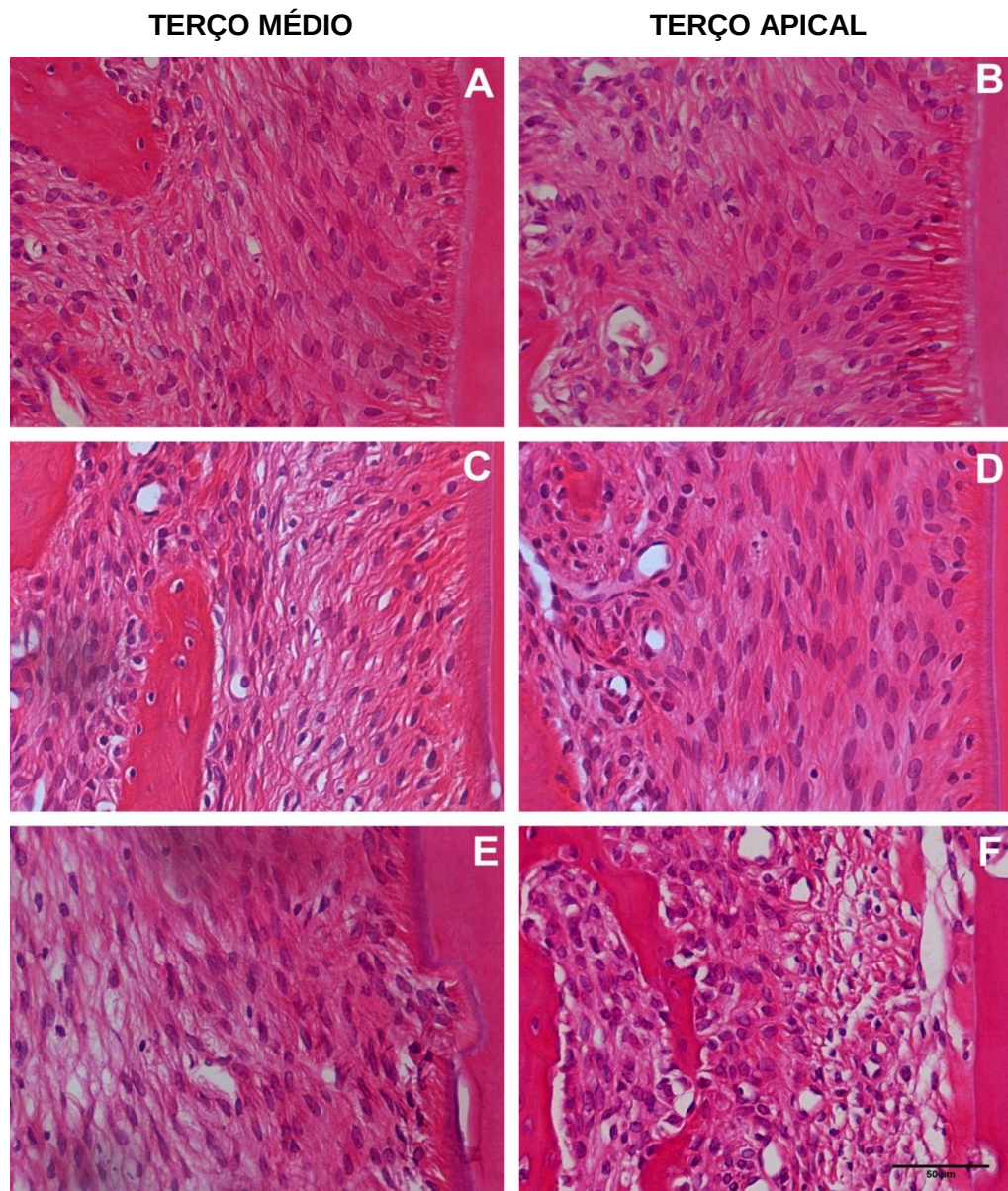
Tabela 4. Distribuição de escores e análise estatística de detalhes histomorfométricos do ligamento periodontal pelo teste Kruskal-Wallis com teste post-hoc de Bonferroni com 5% de nível de significância. Os dados estão apresentados em percentual.

Grupos			
Evento/Escore	SO (%)	AMCC (%)	AMSC (%)
Ligamento periodontal - organização			
1	37,5	11,1	16,7
2	25	22,2	41,7
3	25	55,6	41,7
4	12,5	11,1	0
Comparação entre grupos	A	A	A
Ligamento periodontal – inflamação – intensidade			
1	0	0	0
2	62,5	11,1	41,7
3	25	77,8	41,7
4	12,5	11,1	16,7
Comparação entre grupos	A	A	A
Ligamento periodontal – inflamação - extensão			
1	0	0	0
2	37,5	11,1	41,7
3	50	44,4	41,7
4	12,5	44,4	16,7
Comparação entre grupos	A	A	A
Número total de casos por grupo	8	9	12

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

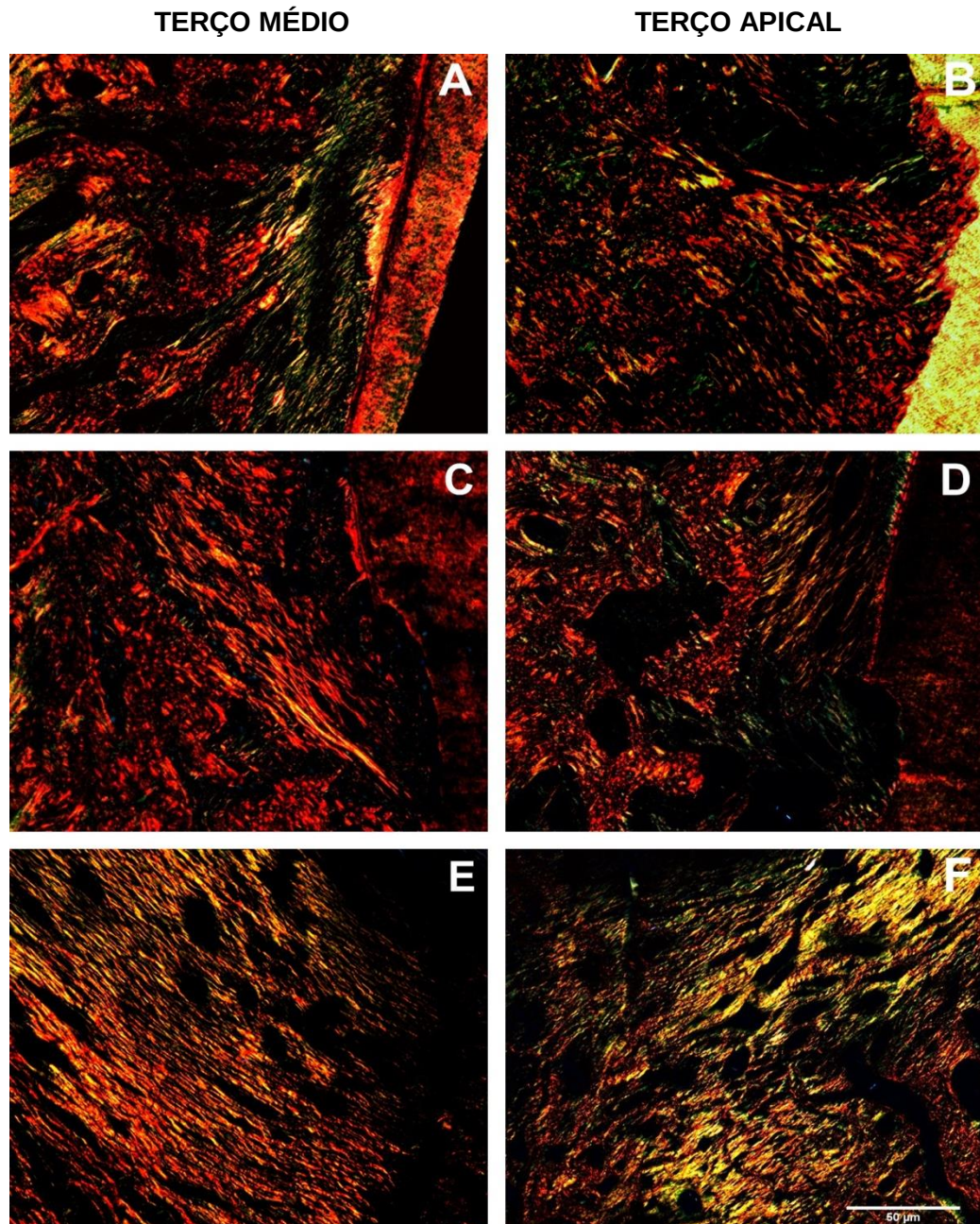
Figura 1. Cortes longitudinais do ligamento periodontal da face palatina do ICSD corados em H.E., sob microscopia de luz. Objetiva de 40x.



Imagens A-B: Grupo SO; C-D: Grupo AMSC; E-F: Grupo AMCC. Em A e B é observado organização do ligamento periodontal, tecido ósseo normal, integridade da camada de cimento e dentina, com presença de algumas células inflamatórias. Em C e D há desorganização das fibras do ligamento periodontal, integridade da camada de cimento e dentina, com presença moderada de células inflamatórias. Em E há presença de reabsorção inflamatória acometendo a porção superficial da raiz. Desorganização das fibras do ligamento periodontal e aumento de matriz extracelular. Em F há perda da integridade da camada de cimento e dentina, com grande desorganização das fibras do ligamento periodontal e intenso número de células inflamatórias.

FONTE: Elaborado pelo autor

Figura 2. Cortes longitudinais do ligamento periodontal da face palatina do ICSD corados em Picrosirius Red, em microscopia de luz polarizada. Objetiva de 20x.



Imagens A-B: Grupo SO; C-D: Grupo AMSC; E-F: Grupo AMCC. Em A observa-se organização das fibras colágenas do ligamento periodontal, com predominância de fibras colágenas tipo III. Em B, há ligeira desorganização das fibras colágenas, com maior área de fibras tipo I. Em C e D há predominância de fibras tipo I, com pouca área de fibras colágenas. Em E e F há maior número de fibras colágenas tipo III, com desorganização das mesmas.

FONTE: Elaborado pelo autor

5. DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia da mistura de α e β -amirina dissolvida em Tween 80 como meio de conservação de dentes avulsionados. No geral, os grupos com a mistura de α e β -amirina apresentaram resultados semelhantes ao grupo armazenado em soro no reparo do ligamento periodontal no terço médio da raiz. Foram encontradas diferenças nos resultados para o terço apical, nessa região o grupo AMCC apresentou maior porcentagem de área de vasos sanguíneos em comparação ao grupo SO. O grupo AMCC também apresentou na análise das fibras colágenas, menor área de fibras Tipo I e maior área de fibras Tipo III, em contrapartida o grupo AMSC apresentou a maior área de fibras tipo I e menor de fibras tipo III.

Apesar das várias propriedades farmacológicas da mistura de α e β -amirina já comprovadas na literatura, incluindo efeitos anticonvulsivantes¹⁶, antidepressivos¹³, gastroprotetores²⁷, hepatoprotetores²⁸, anti-hiperglicêmicos²⁹, assim como analgésicos e antiinflamatórios,^{21,22,30,31} poucos estudam esses efeitos relacionados à área odontológica. O efeito anti-inflamatório apresenta grande emprego dentro da prática do reimplante dentário, uma vez que controlar a inflamação durante o reparo periodontal é de grande importância, pois quando há persistência da inflamação aguda ou crônica durante um grande período, é estabelecido um ambiente que estimula e favorece a ocorrência de reabsorção radicular.^{9,18}

No estudo de Pinto et al., 2008,²¹ foi avaliado o potencial anti-inflamatório da mistura de α e β -amirina em ratos com periodontite em fase aguda, em que os ratos receberam doses da mistura duas horas antes da indução da inflamação, por via sistêmica. Foi visto que houve uma inibição significativa de TNF- α associados à periodontite e as mieloperoxidase gengival (MPO), substâncias pró-inflamatórias. Esses resultados fornecem evidências de que a mistura retarda a inflamação aguda no modelo de periodontite em ratos.

A mistura de α e β -amirina possui baixa solubilidade aquosa, necessitando de solventes orgânicos para sua diluição.¹⁴ Na maioria dos estudos encontrados, o veículo de diluição utilizado foi o polisorbato (Tween 80), em diferentes concentrações, tanto puro como também associado à água destilada.

O tween 80 é um surfactante não iônico da família polioxietileno, constituído por ésteres de ácidos graxos de polioxietileno sorbitol, os surfactantes são produtos

capazes de promover a solubilidade de substâncias hidrofóbicas em água. Para promover a diluição, o tween pode ser utilizado em diversas concentrações, no entanto, concentrações altas podem levar a efeitos citotóxicos as células, principalmente a membrana celular, gerando alterações morfológicas e em sua permeabilidade, já concentrações mais baixas não promovem tal efeito.³² Devido à ausência de estudos com aplicação tópica da mistura de α e β -amirina, foi utilizada uma alta concentração do tween 80 para diluição, o que pode ter impedido a melhor expressão dos efeitos benéficos associados a α e β -amirina de se evidenciarem. Uma vez que quando a viabilidade celular é prejudicada, a célula entra em colapso, levando a sua desvitalização, com isso induzindo o estímulo inflamatório, visando elimina-las.

Os resultados positivos do uso da mistura foram obtidos principalmente por meio da aplicação sistêmica desse composto e diluídas em baixa concentração de tween 80.^{16,13,21,27,31}

Outro fator que pode ter contribuído para inibição dos efeitos da mistura, pode ter sido a reação química ocorrendo entre o Hidróxido de cálcio e o tween 80, no grupo com tratamento de canal. O tween possui em sua composição características ácidas, devido ao éster presente em sua estrutura,³³ por sua vez o hidróxido de cálcio é uma base extremamente forte, em que quando na presença de ácido, ocorre uma reação exotérmica, formando sal e água.³⁴ Essa reação impediria a dissociação esperada do hidróxido de cálcio e sua finalidade como curativo de demora, uma vez que os seus efeitos dependem da dissociação dos íons cálcio e hidroxila.³⁵ Quando ocorre a reação com o ácido, a dissociação desejada não ocorre, impedindo o efeito. O Hidróxido de cálcio atua no estímulo ao reparo tecidual, induzindo a formação de tecido mineralizado e contra microorganismos presentes no canal radicular.³⁶

Utiliza-se o hidróxido de cálcio nos dentes reimplantados objetivando o controle da reabsorção externa e da reabsorção inflamatória da raiz apical.^{37,38} No entanto, o comportamento histológico apresentado pelo grupo AMCC e AMSC foram semelhantes na maioria das variáveis estudadas, o grupo AMSC apresentou apenas algumas diferenças estatísticas, com menos áreas de vaso sanguíneo e também menor número de fibras colágenas do tipo III e maior do tipo I, indicando recuperação mais rápida do ligamento periodontal, já que há um aumento de colágeno tipo III nas fases iniciais de cicatrização, e posteriormente o colágeno imaturo do tipo III é substituído por colágeno do tipo I.³⁹ Esse fato pode estar

também correlacionado a interação entre o hidróxido de cálcio e o tween 80, onde a reação retardou o processo de cicatrização das fibras colágenas.

Por sua vez, o hidróxido de cálcio, quando extravasado para tecidos perirradiculares, pode também induzir uma reação inflamatória local, devido a seu alto pH, causando desnaturação proteica,⁴⁰ com isso podendo levar à degeneração das fibras colágenas.⁴¹

O período extra-alveolar e um adequado meio de conservação influenciam diretamente no sucesso do reimplante, é possível que o tempo de 20 minutos em meio seco adotado em nosso estudo, já tenha causados danos severos as células do ligamento periodontal,⁴² e quando adicionados ao meio de conservação de soro fisiológico e mistura de α e β -amirina, esses apenas evitaram maiores danos às estruturas celulares. Tal ocorrência pode ser a variável que proporcionou um comportamento similar na maioria dos eventos relacionados ao reparo celular nos três grupos, principalmente no terço médio.

Em comparação entre os terços apical e médio da raiz, a área de vasos sanguíneos foi maior no terço apical no grupo AMCC. Provavelmente pela ausência de produtos tóxicos oriundos da necrose pulpar e presença de um feixe vascular mais volumoso nutrindo essa região.

A similaridade do infiltrado inflamatório pode estar relacionada à padronização efetuada durante a cirurgia experimental, realizada com condições assépticas, além do emprego da antibioticoterapia sistêmica após o reimplante.^{43,44}

6. CONCLUSÃO

A mistura de α e β -amirina possui potencial para utilização como meio de conservação em avulsão dentária, no entanto necessita de mais estudos em outras concentrações e meio de diluição para utilização tópica.

REFERÊNCIAS

1. Lam R. Epidemiology and outcomes of traumatic dental injuries: a review of the literature. Australian dental journal, v. 61, n. S1, p. 4-20, 2016.
2. Ugolini A, et al. Work-related traumatic dental injuries: Prevalence, characteristics and risk factors. Dental traumatology, v. 34, n. 1, p. 36-40, 2018.
3. Traebert J, et al. Impact of traumatic dental injuries on the quality of life of schoolchildren. Dental traumatology, v. 28, n. 6, p. 423-428, 2012.
4. Longo DL, et al. Efficiency of different storage media for avulsed teeth in animal models: a systematic review. Dental Traumatology, v. 34, n. 1, p. 12-19, 2018.
5. Dos Santos CLV, et al. Delayed replantation of rat teeth after use of reconstituted powdered milk as a storage medium. Dental Traumatology, v. 25, n. 1, p. 51-57, 2009.
6. Andreasen JO; Andreasen FM. Fundamentos de traumatismo dental: guia de tratamento passo a passo. ArtMed, 2010.
7. Andreasen JO, et al. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 4. Factors related to periodontal ligament healing. Dental Traumatology, v. 11, n. 2, p. 76-89, 1995.
8. Prueksakorn A, et al. The preservative effect of Thai propolis extract on the viability of human periodontal ligament cells. Dental Traumatology, v. 32, n. 6, p. 495-501, 2016.
9. Consolaro A. The four mechanisms of dental resorption initiation. Dental press journal of orthodontics, v. 18, n. 3, p. 7-9, 2013.

10. Melo ME, et al. Immediate tooth replantation in rats: effect of systemic antibiotic therapy with amoxicillin and tetracycline. *Clinical oral investigations*, v. 20, n. 3, p. 523-532, 2016.
11. Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS: atitude de ampliação de acesso / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – 2. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015.
12. Almeida P, et al. Anti-inflammatory activity of triterpenes isolated from *Protium paniculatum* oil-resins. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2015.
13. Aragão GF, et al. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha-and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 85, n. 4, p. 827-834, 2006.
14. Aragão GF, et al. Antiplatelet Activity of α -and β -Amyrin, Isomeric Mixture from *Protium heptaphyllum*. *Pharmaceutical biology*, v. 45, n. 5, p. 343-349, 2007.
15. Aragão GF, et al. Analgesic and anti-inflammatory activities of the isomeric mixture of alpha-and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) march. *Journal of herbal pharmacotherapy*, v. 7, n. 2, p. 31-47, 2008.
16. Aragão GF, et al. Alterations in brain amino acid metabolism and inhibitory effects on PKC are possibly correlated with anticonvulsant effects of the isomeric mixture of α -and β -amyrin from *Protium heptaphyllum*. *Pharmaceutical biology*, v. 53, n. 3, p. 407-413, 2015.
17. Díaz-ruiz G, et al. Growth inhibition of *Streptococcus* from the oral cavity by α -amyrin esters. *Molecules*, v. 17, n. 11, p. 12603-12611, 2012.
18. Melo CM, et al. Anti-inflammatory effect of α , β -amyrin, a triterpene from *Protium heptaphyllum*, on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Inflammation research*, v. 60, n. 7, p. 673-681, 2011.

19. Okoye NN, et al. beta-Amyrin and alpha-amyrin acetate isolated from the stem bark of *Alstonia boonei* display profound anti-inflammatory activity. *Pharmaceutical biology*, v. 52, n. 11, p. 1478-1486, 2014.
20. Pinto SAH, et al. Antinociceptive effect of triterpenoid α , β -amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. *Phytomedicine*, v. 15, n. 8, p. 630-634, 2008.
21. Pinto SAH, et al. Anti-inflammatory effect of α , β -amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. *Inflammopharmacology*, v. 16, n. 1, p. 48-52, 2008.
22. Santos FA, et al. Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α , β -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. *Lipids in Health and Disease*, v. 11, n. 1, p. 98, 2012.
23. Soldi C, et al. Synthetic derivatives of the α -and β -amyrin triterpenes and their antinociceptive properties. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 16, n. 6, p. 3377-3386, 2008.
24. Vieira-Júnior GMV; De Souza CML; Chaves MH. Resina de *Protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. *Quim. Nova*, v. 28, n. 2, p. 183-187, 2005.
25. Lima EM, et al. Triterpenes from the *Protium heptaphyllum* resin-chemical composition and cytotoxicity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 24, n. 4, p. 399-407, 2014.
26. Panzarini SR, et al. Mineral trioxide aggregate as a root canal filling material in reimplanted teeth. Microscopic analysis in monkeys. *Dental Traumatology*, v. 23, n. 5, p. 265-272, 2007.
27. Oliveira FA, Lima-Junior RC, Cordeiro WM, Vieira-Júnior GM, Chaves MH, Almeida FR, Silva RM, Santos FA, Rao VS. Pentacyclic triterpenoids, α , β -

amyrins, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus. *Pharmacol Biochem Behav.* 2004 Aug;78(4):719-25.

28. Oliveira FA, Chaves MH, Almeida FR, Lima RC Jr, Silva RM, Maia JL, Brito GA, Santos FA, Rao VS. Protective effect of alpha- and beta-amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. *J Ethnopharmacol.* 2005 Apr 8;98(1-2):103-8.
29. Prabhakar P, Reeta K.H., Maulik S.K. et al. α -Amyrin attenuates high fructose diet-induced metabolic syndrome in rats. *Physiol. Nutr. Metab.* (2017) 42 23– 32.
30. Bhat R.A., Lingaraju M.C., Pathak N.N. et al. Effect of ursolic acid in attenuating chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Fundam. Clin. Pharmacol.* (2016) 30 517– 528.
31. Melo C.M., Morais T.C., Tomé A.R., et al. Anti-inflammatory effect of α , β -amyrin, a triterpene from *Protium heptaphyllum*, on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Inflamm. Res.* (2011) 60 673– 681.
32. Rege BD, Kao JP, Polli JE. Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers. *Eur J Pharm Sci.* 2002 Sep;16(4-5):237-46.
33. Kerwin BA. Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: structure and degradation pathways. *J Pharm Sci.* 2008 Aug;97(8):2924-35.
34. Chang R. Química Geral: conceitos essenciais, McGrawHill, 4^a. 2007.
35. Estrela C, Pesce HF. Chemical analysis of the release of calcium and hydroxyl ions from Calcium hydroxide in connective tissue in dogs - Part I. *Braz Dent J* (1996) 7 (1): 41-46.

36. Holland R, Souza V, Nery MJ, Bernabé DFE, Mello W, Otoboni Filho JA: Deposição apical de tecido duro em dentes adultos de macacos com uso de hidróxido de cálcio. *Aust Dent J* 25: 189-192, 1980.
37. Haapsalo M, Endal U. Internal inflammatory root resorption: the unknown resorption of the tooth. *Endodontic topics*, v. 14, n. 1, p. 60-79, 2006.
38. Majorana A, Bardellini E, Conti G, Keller E, Pasini S. Root resorption in dental trauma: 45 cases followed for 5 years. *Dent Traumatol*. 2003 Oct;19(5):262-5.
39. Kaku M, Yamauchi M. Mechano-regulation of collagen biosynthesis in periodontal ligament. *J Prosthodont Res*. 2014 Oct;58(4):193-207.
40. Marão HF, Panzarini SR, Aranega AM, Sonoda CK, Poi WR, Esteves JC, Silva PI. Periapical tissue reactions to calcium hydroxide and MTA after external root resorption as a sequela of delayed tooth replantation. *Dent Traumatol*. 2012 Aug;28(4):306-13.
41. Andreasen JO, Farik B, Munksgaard EC. Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dent Traumatol*. 2002 Jun;18(3):134-7.
42. Andreasen JO, Schwartz O. The effect of saline storage before replantation upon dry damage of the periodontal ligament. *Endod Dent Traumatol*. 1986 Apr;2(2):67-70.
43. Hammarström L, Blomlöf L, Feiglin B, Andersson L, Lindskog S. Replantation of teeth and antibiotic treatment. *Endod Dent Traumatol* 1986;2:51-7.
44. Melo ME, Silva CA, de Souza Gomes WD, da Silva VF, Brandini DA, Poi WR, Castilho LR, Sonoda CK, Panzarini SR. Immediate tooth replantation in rats: effect of systemic antibiotic therapy with amoxicillin and tetracycline. *Clin Oral Investig*. 2016 Apr;20(3):523-32.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Uso da alfa e beta amirina no tratamento de superfície em replante dentário imediato**", Processo FOA nº 00467-2018, sob responsabilidade de Daniela Atili Brandini de Weert apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 20 de Julho de 2018.

VALIDADE DESTES CERTIFICADO: 20 de Abril de 2020.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 20 de Maio de 2020.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Use of alfa and beta amirin in surface treatment in immediate dental replantation**", Protocol FOA nº 00467-2018, under the supervision of Daniela Atili Brandini de Weert presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on July 20, 2018.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: April 20, 2020.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: May 20, 2020.


Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

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

ANEXO B – Normas do periódico “Dental Traumatology”

Author Guidelines

Sections

- [1. Submission](#)
- [2. Aims and Scope](#)
- [3. Manuscript Categories and Requirements](#)
- [4. Preparing the Submission](#)
- [5. Editorial Policies and Ethical Considerations](#)
- [6. Author Licensing](#)
- [7. Publication Process After Acceptance](#)
- [8. Post Publication](#)
- [9. Editorial Office Contact Details](#)

1. SUBMISSION

Authors should kindly note that submission implies that the content has not been published or submitted for publication elsewhere except as a brief abstract in the proceedings of a scientific meeting or symposium.

Once the submission materials have been prepared in accordance with the Author Guidelines, manuscripts should be submitted online at <https://mc.manuscriptcentral.com/dt>

[Click here](#) for more details on how to use ScholarOne.

Data protection

By submitting a manuscript to or reviewing for this publication, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services, and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more at <https://authorservices.wiley.com/statements/data-protection-policy.html>.

Preprint policy

Dental Traumatology does not accept articles that have been uploaded to a preprint server.

For help with submissions, please contact: EDToffice@wiley.com

2. AIMS AND SCOPE

Dental Traumatology is an international peer-reviewed journal which aims to convey scientific and clinical progress in all areas related to adult and pediatric dental traumatology. It aims to promote communication among clinicians, educators, researchers, administrators and others interested in dental traumatology. The journal publishes original scientific articles, review articles in the form of comprehensive reviews or mini reviews of a smaller area, short communication about clinical methods or techniques, Letters to the Editor and case reports. The journal focuses on the following areas **as they relate to dental trauma:**

- Epidemiology and Social Aspects
- Periodontal and Soft Tissue Aspects
- Endodontic Aspects
- Pediatric and Orthodontic Aspects
- Oral and Maxillofacial Surgery / Transplants/ Implants
- Esthetics / Restorations / Prosthetic Aspects
- Prevention and Sports Dentistry
- Epidemiology, Social Aspects, Education and Diagnostic Aspects.

3. MANUSCRIPT CATEGORIES AND REQUIREMENTS

Original Research Articles in all areas related to adult and pediatric dental traumatology are of interest to *Dental Traumatology*. Examples of such areas are Epidemiology and Social Aspects, Periodontal and Soft Tissue Aspects, Endodontic Aspects, Pediatric and Orthodontic Aspects, Oral and Maxillofacial Surgery/Transplants/Implants, Esthetics/Restorations/Prosthetic Aspects, Prevention and Sports Dentistry, Epidemiology, Social Aspects, Education and Diagnostic Aspects.

Review Papers: *Dental Traumatology* commissions specific topical review papers and mini reviews of small areas of interest. The journal also welcomes uninvited reviews. Reviews should be submitted via the online submission site and are subject to peer-review.

Comprehensive Reviews should be a complete coverage of a subject discussed with the Editor-in-Chief prior to submission. Comprehensive review articles should include a description of the search strategy of the relevant literature, the inclusion criteria, exclusion criteria, method for evaluation of papers, level of evidence, etc.

Mini Reviews cover a smaller area and may be written in a more free format.

Case Reports: *Dental Traumatology* may accept Case Reports that illustrate unusual and clinically relevant observations or management. Case reports should demonstrate something new or unique, and they should not present common clinical scenarios. Case reports should be kept brief (within 3-4 printed pages) and need not follow the usual division into Material and Methods etc. There should be an Abstract written as a short paragraph. The Abstract should not be structured with specific sections (i.e. do not use aims, methods, results, conclusions). The Introduction should be kept short. Thereafter the case is described followed by a short Discussion. Case reports should have adequate follow-up to demonstrate the outcome of the treatment provided or the long-term prognosis of the presented problem. Typically, cases with treatment should have at

least 4-5 years follow-up radiographs, photographs, etc. to show the outcome. Case reports are subject to peer review.

Short Communications of 1-2 pages may be accepted for publication. These papers need not follow the usual division into Material and Methods, etc., but should have an Abstract. They should contain important new information to warrant publication and may reflect improvements in clinical practice such as introduction of new technology or practical approaches. They should conform to high scientific and high clinical practice standards. Short communications are subject to peer review.

Letters to the Editor may be considered for publication if they are of broad interest to dental traumatology. They may deal with material in papers already published in Dental Traumatology or they may raise new issues, but they should have important implications for dental traumatology.

Meetings: advance information about and reports from international meetings are welcome, but should not be submitted via the online submission site – these should be sent directly to the Editorial Office: EDToffice@wiley.com

4. PREPARING THE SUBMISSION

Cover Letters

Cover letters are not mandatory; however, they may be supplied at the author's discretion.

Parts of the Manuscript

The manuscript should be submitted in separate files: title page; main text file; figures.

Title Page

The title page should contain:

1. a short informative title containing the major key words. The title should not contain abbreviations (see [Wiley's best practice SEO tips](#)) and should not be a question about the aim. The title should not be a statement of the results or conclusions;
2. A short running title of less than 60 characters;
3. The full names of the authors;
4. The author's institutional affiliations where the work was conducted, with a footnote for the author's present address if different from where the work was conducted;
5. Acknowledgments.

Authorship

Please refer to the journal's authorship policy the [Editorial Policies and Ethical Considerations section](#) for details on eligibility for author listing.

Acknowledgments

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section. Financial and material support should also be mentioned. Thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

Conflict of Interest Statement

Authors will be asked to provide a conflict of interest statement during the submission process. For details on what to include in this section, see the section 'Conflict of Interest' in the [Editorial Policies and Ethical Considerations section](#) below. Submitting authors should ensure they liaise with all co-authors to confirm agreement with the final statement.

Main Text File

As papers are double-blind peer reviewed, the main text file should not include any information that might identify the authors.

The main text file should be presented in the following order:

1. Title, abstract, and key words;
2. Main text;
3. References;
4. Tables (each table complete with title and footnotes);
5. Figure legends.

Do not use any sub-headings within the above sections.

The text in the main document should be double-spaced.

Figures and supporting information should be supplied as separate files.

Abstract

The abstract is limited to 300 words in length and should contain no abbreviations. The abstract should be included in the manuscript document uploaded for review as well as inserted separately where specified in the submission process. The abstract should convey a brief background statement plus the essential purpose and message of the paper in an abbreviated form. For Original Scientific Articles, the abstract should be structured with the following headings: Background/Aim, Material and Methods, Results, and Conclusions. For other article types (e.g. Case Reports, Reviews Papers, Short Communications) headings are not required and the Abstract should be in the form of a paragraph that briefly summarizes the paper.

Keywords

Please provide 3-6 keywords. Keywords should be carefully chosen to ensure they reflect the content of the manuscript.

Main Text of Original Articles

- As papers are double-blind peer reviewed, the main text file should not include any information that might identify the authors.
- The main text should be divided into the following sections: Introduction, Material and Methods, Results and Discussion.

- **Introduction:** This section should be focused, outlining the historical or logical origins of the study. It should not summarize the results and exhaustive literature reviews are inappropriate. Give only strict and pertinent references and do not include data or conclusions from the work being reported. The introduction should close with an explicit, but brief, statement of the specific aims of the investigation or hypothesis tested. Do not include details of the methods in the statement of the aims.
- **Materials and Methods:** This section must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced. As a condition of publication, authors are required to make materials and methods used freely available to academic researchers for their own use. Describe your selection of observational or experimental participants clearly. Identify the method, apparatus and procedures in sufficient detail. Give references to established methods, including statistical methods, describe new or modified methods. Identify precisely all drugs used by their generic names and route of administration. If a method or tool is introduced in the study, including software, questionnaires, and scales, the author should state the license this is available under and any requirement for permission for use. If an existing method or tool is used in the research, the authors are responsible for checking the license and obtaining the permission. If permission was required, a statement confirming permission should be included in the Methods and Materials section.
- **Results** should clearly and simply present the observations/results without reference to other literature and without any interpretation of the data. Present the results in a logical sequence in the text, tables and illustrations giving the main or most important findings first. Do not duplicate data in graphs and tables.
- **Discussion** usually starts with a brief summary of the major findings. Repetition of parts of the Introduction or of the Results sections should be avoided. Statements and interpretation of the data should be appropriately supported by original references. A comment on the potential clinical relevance of the findings should be included. The Discussion section should end with a brief conclusion, but the conclusion should not be a repeat of the results and it should not extrapolate beyond the findings of the study. Link the conclusions to the aim of the study. Do not use sub-headings in the Discussion section, The Discussion should flow from one paragraph to the next in a cohesive and logical manner.

Main Text of Review Articles

- As papers are double-blind peer reviewed, the main text file should not include any information that might identify the authors.
- The main text should comprise an introduction and a running text structured in a suitable way according to the subject treated. A final section with conclusions may be added.
- The main text should be double-spaced.

References

All references should be numbered consecutively in order of appearance and should be as complete as possible. In text citations should be superscript numbers. Journal titles must be abbreviated; correct abbreviations may be found in the following: [MEDLINE](#), [Index Medicus](#), or [CalTech Library](#).

Submissions are not required to reflect the precise reference formatting of the journal (use of italics, use of capital letters, bold etc.). However it is important that all key elements of each reference are included. Please see below for examples of reference content requirements.

For more information about this reference style, please see the [Vancouver Reference Style Guide](#).

Reference examples follow:

Journal Articles

Lam R, Abbott PV, Lloyd C, Lloyd CA, Kruger E, Tennant M. Dental trauma in an Australian Rural Centre. *Dent Traumatol* 2008; 24: 663-70.

Text book chapters

Andreasen J, Andreasen F. Classification, etiology and epidemiology. IN: Andreasen JO, Andreasen FM, eds. *Textbook and Color Atlas of Traumatic Injuries to the Teeth*. 3rd Edn. Munksgaard, Copenhagen. 1994;151-80.

Thesis or Dissertation

Lauridsen, E. Dental trauma – combination injuries. Injury pattern and pulp prognosis for permanent incisors with luxation injuries and concomitant crown fractures. Denmark: The University of Copenhagen. 2011. PhD Thesis.

Corporate Author

European Society of Endodontology. Quality guidelines for endodontic treatment: consensus report of the European Society of Endodontology. *Int Endod J* 2006;39;921-30.

American Association of Endodontists. The treatment of traumatic dental injuries. Available at: URL: 'http://www.aae.org/uploadedfiles/publications_and_research/newsletters/endodontics_colleagues_for_excellence_newsletter/ecfe_summer2014%20final.pdf'. Accessed September 2015.

Tables

Tables should be self-contained and complement, not duplicate, information contained in the text. They should be supplied as editable files, not pasted as images. Legends should be concise but comprehensive – the table, legend, and footnotes must be understandable without reference to the text. All abbreviations must be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, §, ¶, should be used (in that order) and *, **, *** should be reserved for P-values. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings.

Figure Legends

Legends should be concise but comprehensive – the figure and its legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement.

Figures

Although authors are encouraged to send the highest-quality figures possible, for peer-review purposes, a wide variety of formats, sizes, and resolutions are accepted.

[Click here](#) for the basic figure requirements for figures submitted with manuscripts for initial peer review, as well as the more detailed post-acceptance figure requirements.

Color Figures. Figures submitted in color will be reproduced in colour online. Please note, however, that it is preferable that line figures (e.g. graphs and charts) are supplied in black and white so that they are legible if printed by a reader in black and white.

Data Citation

Please review [Wiley's data citation policy](#).

Additional Files

Appendices

The journal does not publish material such as Appendices. They should be submitted as Figures or Tables.

Supporting Information

Supporting information is information that is not essential to the article, but provides greater depth and background. Supporting information or Appendices may be hosted online and appear without editing or typesetting. It may include tables, figures, videos, datasets, etc.

[Click here](#) for Wiley's FAQs on supporting information.

Note: if data, scripts, or other artefacts used to generate the analyses presented in the paper are available via a publicly available data repository, authors should include a reference to the location of the material within their paper.

General Style Points

The following points provide general advice on formatting and style.

- **Use double spacing for all text.**
- **Abbreviations, Symbols and Nomenclature:** Abbreviations should be kept to a minimum, particularly those that are not standard. Non-standard abbreviations must be used three or more times – otherwise they should not be used. The full words should be written out completely in the text when first used, followed by the abbreviation in parentheses. Consult the following sources for additional abbreviations: 1) CBE Style Manual Committee. Scientific style and format: the CBE manual for authors, editors, and publishers. 6th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1994; and 2) O'Connor M, Woodford FP. Writing scientific papers in English: an ELSE-Ciba Foundation guide for authors. Amsterdam: Elsevier-Excerpta Medica; 1975.

- As *Dental Traumatology* is an international journal with wide readership from all parts of the world, the **FDI Tooth Numbering system** MUST be used. This system uses two digits to identify teeth according to quadrant and tooth type. The first digit refers to the quadrant and the second digit refers to the tooth type – for example: tooth 11 is the maxillary right central incisor and tooth 36 is the mandibular left first molar. Alternatively, the tooth can be described in words. Other tooth numbering systems will not be accepted.
- **Numbers:** Numbers under 10 are spelt out as words, and not shown as numerals, except for: measurements with a unit (8mmol/l); age (6 weeks old), or lists with other numbers (11 dogs, 9 cats, 4 gerbils).
- **When referring to a figure**, spell the word out (e.g. Figure 2 shows the patient's injuries on initial presentation). When referring to a figure at the end of a sentence, enclose it in parentheses - e.g. *The patient's maxillary central incisor was repositioned and splinted* (Figure 5).
- **Page numbering:** During the editorial process, reviewers and editors frequently need to refer to specific portions of the manuscript, which is difficult unless the pages are numbered. Hence, authors should number all of the pages consecutively at the bottom of the page.
- Scientific papers should not be written in the 1st person – that is, avoid using “we”, “our”, etc. As examples, use words such as the ‘current study’, “the results”, “samples were tested”, instead of “our study”, “our results”, “we tested”, etc.
- Care must be taken with the use of tense (usually the past tense is the most appropriate).
- Care must be taken with the use of singular and plural words.
- **Trade Names:** Chemical substances should be referred to by the generic name only. Trade names should not be used. Drugs should be referred to by their generic names. If proprietary drugs have been used in the study, refer to these by their generic name, mentioning the proprietary name and the name and location of the manufacturer in parentheses.

Reproduction of Copyright Material

If excerpts from copyrighted works owned by third parties are included, credit must be shown in the contribution. It is the author's responsibility to also obtain written permission for reproduction from the copyright owners. For more information visit Wiley's Copyright Terms & Conditions FAQ at http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-terms--conditions_301.html

Wiley Author Resources

Manuscript Preparation Tips: Wiley has a range of resources for authors preparing manuscripts for submission available [here](#). In particular, authors may benefit from referring to Wiley's best practice tips on [Writing for Search Engine Optimization](#).

Editing, Translation, and Formatting Support: [Wiley Editing Services](#) can greatly improve the chances of a manuscript being accepted. Offering expert help in English language editing, translation, manuscript formatting, and figure preparation, Wiley Editing Services ensures that the manuscript is ready for submission.

Video Abstracts: A video abstract can be a quick way to make the message of your research accessible to a much larger audience. Wiley and its partner Research Square

offer a service of professionally produced video abstracts, available to authors of articles accepted in this journal. You can learn more about it by [clicking here](#). If you have any questions, please direct them to videoabstracts@wiley.com.

5. EDITORIAL POLICIES AND ETHICAL CONSIDERATIONS

Peer Review and Acceptance

The acceptance criteria for all papers are the quality and originality of the research and its significance to journal readership. Manuscripts are double-blind peer reviewed, hence, the names of the reviewers will not be disclosed to the author(s) who have submitted the paper and the name(s) of the author(s) will not be disclosed to the reviewers.

To allow double blinded review, please submit (upload) your main manuscript and title page as separate files.

Papers will only be sent to review if the Editor-in-Chief determines that the paper meets the appropriate quality and relevance requirements.

Wiley's policy on the confidentiality of the review process is [available here](#).

Appeal of Decision

The Editor-in-Chief's decision to accept, reject or require revision of a paper is final and it cannot be appealed.

Human Studies and Subjects

For manuscripts reporting studies that involve human participants, a statement identifying the ethics committee that approved the study and confirmation that the study conforms to recognized standards is required, for example: [Declaration of Helsinki](#); [US Federal Policy for the Protection of Human Subjects](#); or [European Medicines Agency Guidelines for Good Clinical Practice](#). It should also state clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. These statements must be included in the Methods section of the manuscript.

Patient anonymity should be preserved. When detailed descriptions, photographs, or videos of faces or identifiable body parts are used that may allow identification, authors should obtain the individual's free prior informed consent. Authors do not need to provide a copy of the consent form to the publisher; however, in signing the author license to publish, authors are required to confirm that consent has been obtained. Wiley has a [standard patient consent form](#) available for use. Where photographs are used they need to be cropped sufficiently to prevent human subjects being recognized; black eye bars should not be used as they do not sufficiently protect an individual's identity.

Animal Studies

A statement indicating that the protocol and procedures employed were ethically reviewed and approved, as well as the name of the body giving approval, must be included in the Methods section of the manuscript. Authors are encouraged to adhere to animal research reporting standards, for example the [ARRIVE guidelines](#) for reporting study design and statistical analysis; experimental procedures; experimental animals and housing and husbandry. Authors should also state whether experiments were performed in accordance with relevant institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals:

- US authors should cite compliance with the [US National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals](#), the [US Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals](#), and [Guide for the Care and Use of Laboratory Animals](#).
- UK authors should conform to UK legislation under the [Animals \(Scientific Procedures\) Act 1986 Amendment Regulations \(SI 2012/3039\)](#).
- European authors outside the UK should conform to [Directive 2010/63/EU](#).

Clinical Trial Registration

The journal requires that clinical trials are prospectively registered in a publicly accessible database and clinical trial registration numbers should be included in all papers that report their results. Authors are asked to include the name of the trial register and the clinical trial registration number at the end of the abstract. If the trial is not registered, or was registered retrospectively, the reasons for this should be explained.

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A [CONSORT checklist](#) should also be included in the submission material.

Suppliers of materials

Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.

Guidelines on Publishing and Research Ethics in Journal Articles

Please review [Wiley's policies surrounding human studies, animal studies, clinical trial registration, biosecurity, and research reporting guidelines](#).

Sequence Data

Nucleotide sequence data can be submitted in electronic form to any of the three major collaborative databases: DDBJ, EMBL, or GenBank. It is only necessary to submit to one database as data are exchanged between DDBJ, EMBL, and GenBank on a daily basis. The suggested wording for referring to accession-number information is: 'These sequence data have been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession number U12345'. Addresses are as follows:

- DNA Data Bank of Japan (DDBJ): www.ddbj.nig.ac.jp
- EMBL Nucleotide Archive: ebi.ac.uk/ena
- GenBank: www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank

Proteins sequence data should be submitted to either of the following repositories:

- Protein Information Resource (PIR): pir.georgetown.edu
- SWISS-PROT: expasy.ch/sprot/sprot-top

Conflict of Interest

The journal requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or directly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include, but are not limited to: patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication. If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and collectively to disclose with the submission ALL pertinent commercial and other relationships.

Funding

Authors should list all funding sources in the Acknowledgments section. Authors are responsible for the accuracy of their funder designation. If in doubt, please check the Open Funder Registry for the correct nomenclature: <https://www.crossref.org/services/funder-registry/>

Authorship

The list of authors should accurately illustrate who contributed to the work and how. All those listed as authors should qualify for authorship according to the following criteria:

1. Have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; and
2. Been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; and
3. Given final approval of the version to be published. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content; and
4. Agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section (for example, to recognize contributions from people who provided technical help, collation of data, writing assistance, acquisition of funding, or a department chairperson who provided general support). Prior to submitting the article all authors should agree on the order in which their names will be listed in the manuscript.

Additional Authorship Options. Joint first or senior authorship: In the case of joint first authorship, a footnote should be added to the author listing, e.g. 'X and Y should be considered joint first author' or 'X and Y should be considered joint senior author.'

Data Sharing and Data Accessibility

The journal encourages authors to share the data and other artefacts supporting the results in the paper by archiving it in an appropriate public repository. Authors should include a data accessibility statement, including a link to the repository they have used, in order that this statement can be published alongside their paper.

Publication Ethics

This journal is a member of the [Committee on Publication Ethics \(COPE\)](#). Note this journal uses iThenticate's CrossCheck software to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts. Read Wiley's Top 10 Publishing Ethics Tips for Authors [here](#). Wiley's Publication Ethics Guidelines can be found [here](#).

ORCID

As part of the journal's commitment to supporting authors at every step of the publishing process, the journal requires the submitting author (only) to provide an ORCID iD when submitting a manuscript. This takes around 2 minutes to complete. [Find more information here.](#)

6. AUTHOR LICENSING

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author will receive an email prompting them to log in to Author Services, where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be required to complete a copyright license agreement on behalf of all authors of the paper.

Authors may choose to publish under the terms of the journal's standard copyright agreement, or [OnlineOpen](#) under the terms of a Creative Commons License.

General information regarding licensing and copyright is available [here](#). To review the Creative Commons License options offered under OnlineOpen, please [click here](#). (Note that certain funders mandate that a particular type of CC license has to be used; to check this please click [here](#).)

Self-Archiving definitions and policies. Note that the journal's standard copyright agreement allows for self-archiving of different versions of the article under specific conditions. Please [click here](#) for more detailed information about self-archiving definitions and policies.

Open Access fees: If you choose to publish using OnlineOpen you will be charged a fee. A list of Article Publication Charges for Wiley journals is available [here](#).

Funder Open Access: Please click [here](#) for more information on Wiley's compliance with specific Funder Open Access Policies.

7. PUBLICATION PROCESS AFTER ACCEPTANCE

Accepted article received in production

When an accepted article is received by Wiley's production team, the corresponding author will receive an email asking them to login or register with [Wiley Author Services](#). The author will be asked to sign a publication license at this point.

Accepted Articles

The journal offers Wiley's Accepted Articles service for all manuscripts. This service ensures that accepted 'in press' manuscripts are published online shortly after acceptance, prior to copy-editing or typesetting. Accepted Articles are published online a

few days after final acceptance and appear in PDF format only. They are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked and are indexed by PubMed. After the final version article is published (the article of record), the DOI remains valid and can still be used to cite and access the article.

Accepted Articles will be indexed by PubMed; submitting authors should therefore carefully check the names and affiliations of all authors provided in the cover page of the manuscript so it is accurate for indexing. Subsequently, the final copyedited and proofed articles will appear in an issue on Wiley Online Library; the link to the article in PubMed will update automatically.

Proofs

Once the paper is typeset, the author will receive an email notification with full instructions on how to provide proof corrections.

Please note that the author is responsible for all statements made in their work, including changes made during the editorial process – authors should check proofs carefully. Note that proofs should be returned within 48 hours from receipt of first proof.

Early View

The journal offers rapid speed to publication via Wiley's Early View service. [Early View](#) (Online Version of Record) articles are published on Wiley Online Library before inclusion in an issue. Note there may be a delay after corrections are received before the article appears online, as Editors also need to review proofs. Once the article is published on Early View, no further changes to the article are possible. The Early View article is fully citable and carries an online publication date and DOI for citations.

8. POST PUBLICATION

Access and sharing

When the article is published online:

- The author receives an email alert (if requested).
- The link to the published article can be shared through social media.
- The author will have free access to the paper (after accepting the Terms & Conditions of use, they can view the article).
- The corresponding author and co-authors can nominate up to ten colleagues to receive a publication alert and free online access to the article.

Promoting the Article

To find out how to best promote an article, [click here](#).

Measuring the Impact of an Article

Wiley also helps authors measure the impact of their research through specialist partnerships with [Kudos](#) and [Altmetric](#).

Archiving Services

Portico and CLOCKSS are digital archiving/preservation services we use to ensure that Wiley content will be accessible to customers in the event of a catastrophic event such

as Wiley going out of business or the platform not being accessible for a significant period of time. Member libraries participating in these services will be able to access content after such an event. Wiley has licenses with both Portico and CLOCKSS, and all journal content gets delivered to both services as it is published on Wiley Online Library. Depending on their integration mechanisms, and volume loads, there is always a delay between content being delivered and showing as “preserved” in these products.

9. EDITORIAL OFFICE CONTACT DETAILS

For queries about submissions, please contact EDToffice@wiley.com

Author Guidelines Updated 22 February 2019