



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

LEONARDO RANIEL FIGUEIREDO

**INFLUÊNCIA DO ZOLEDRONATO DE SÓDIO NO
REIMPLANTE DENTÁRIO TARDIO. ESTUDO
HISTOMÉTRICO EM RATOS**

Araçatuba
2023

LEONARDO RANIEL FIGUEIREDO

**INFLUÊNCIA DO ZOLEDRONATO DE SÓDIO NO
REIMPLANTE DENTÁRIO TARDIO. ESTUDO
HISTOMÉTRICO EM RATOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, para obtenção do grau de “Doutor em Odontologia” - Área de concentração em Clínica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Celso Koogi Sonoda

Araçatuba
2023

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

F475i Figueiredo, Leonardo Raniel.
Influência do zolendronato de sódio no reimplante dentário tardio : estudo histométrico em ratos / Leonardo Raniel Figueiredo. - Araçatuba, 2023
53 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Celso Koogi Sonoda

1. Reimplante dentário 2. Difosfonatos 3. Reabsorção da raiz I. T.

Black D2
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

A minha família; aos meus pais, Francisco e Valéria e ao meu irmão Lucas. Eles que são meus maiores incentivadores, minha base e minha fonte de força e de amor. Obrigado por tanto, essa conquista é nossa!

AGRADECIMENTOS

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

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia UNESP – Araçatuba, Prof. Dr. Wirley Gonçalves Assunção pelo acolhimento para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria de Pós-graduação, pela atenção, disponibilidade, paciência e simpatia concedida durante todas as etapas.

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

Aos funcionários do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Paulo, Renato e Marco. Muito obrigada por toda ajuda, atenção e disponibilidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pelo auxílio financeiro de bolsa durante parte do período de desenvolvimento deste trabalho.

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

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

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha família, minha mãe Valéria e meu irmão Lucas, por todo o amor, suporte e acolhimento, essa conquista também é de vocês. O caminho até aqui só foi possível por vocês, minha eterna gratidão e amor as pessoas mais importantes da minha vida.

Ao meu pai, Francisco (*in memoriam*), dedico de forma especial esse trabalho. Sua partida ocorreu durante meu tempo no doutorado, e as cicatrizes até hoje estão presentes. Porém, o seu exemplo, amor e cuidado estarão sempre comigo, obrigado por tudo meu herói, independente para onde a vida me leve, você estará comigo.

A minhas avós (Idalina e Eunice), avô (Guarino), tios, padrinhos, primos, cunhada e sobrinha. Um orgulho fazer parte desta família, e todos vocês também fizeram parte desse caminho, obrigado a todos.

A meus amigos Heitor, André, Lourenço, Caio, Afonso, Thainan, Luis Eduardo, Luis Felipe, Guilherme. Obrigado por todos os momentos, o companheirismo e a amizade. Como diz uma música “É se dar sem esperar, nada em troca dessa união, é ter alguém pra contar na indecisão. Nunca se desesperar, sempre ali pra estender a mão, maior valor não há, é feito irmão”. Obrigado meus irmãos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Celso Koogi Sonoda, por ser meu mentor em minha caminhada na pesquisa. Iniciação científica, Mestrado, e doutorado tendo o privilégio de ser orientado por esse grande profissional. Muito obrigado professor, o senhor é a minha maior referência de o que um docente, orientador e cirurgião dentista deve ser.

Ao meu amigo Luy de Abreu Costa, pela amizade e por toda a ajuda no desenvolvimento deste projeto. Sem sua participação, a conclusão deste trabalho seria muito mais difícil.

Aos docentes da disciplina de Clínica Integrada, Daniela Atili Brandini de Weert, Aline Satie Takamiya, Marina Fuzette, Luiza Monzoli Covre e Douglas Roberto Monteiro. Minha gratidão por poder conviver, e trabalhar junto a pessoas maravilhosas, e profissionais de excelência.

“Em tempos assim, você aprende a viver de novo. Em tempos assim, você se entrega de novo. Em tempos assim, você aprende a amar de novo. Tempos assim vivem se repetindo.

Dave Grohl

Figueiredo LR. Influência do Zoledronato de sódio no reimplante dentário tardio. Estudo histométrico em ratos [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2023.

RESUMO

O grande desafio nos casos de reimplante dentário tardio é a reabsorção radicular que pode levar a perda do dente reimplantado. Para isso novas pesquisas buscam meios para o seu controle e assim melhorar o prognóstico desses dentes. Drogas como os bisfosfonatos (BF), que possuem efeito antirreabsortivo no tecido ósseo, também poderiam contribuir para o controle da reabsorção radicular após traumatismo dentário. Esse estudo se propôs assim, a estudar o efeito do ácido zoledrônico (ZOL) no processo de reparo do reimplante tardio de dentes de ratos. Para isso foram utilizados 40 ratos que tiveram o incisivo superior direito extraído e mantido em meio seco por 60 minutos. Na sequência a superfície radicular foi limpa com gaze embebida em soro fisiológico e os dentes foram divididos em 4 grupos de dez. No **grupo C (Controle)**, os dentes foram então imersos em 10ml de soro fisiológico por 10 minutos, seguido de remoção da polpa, preenchimento do canal com hidróxido de cálcio (CAOH) e confecção de um “plug” apical com cimento MTA. O tempo decorrido para o tratamento endodôntico foi de 10 minutos. No grupo **BC (ZOL como curativo de canal)**, os dentes foram imersos em 10ml de soro fisiológico por 10 minutos, e os canais radiculares foram preenchidos com ZOL. No grupo **BSI (ZOL sistêmico)** os dentes foram imersos em 10ml de soro fisiológico por 10 minutos e os canais radiculares foram preenchidos com CAOH. Os animais receberam por via intraperitoneal, dose de ZOL a 100 µg/Kg em 0,45 ml de NaCl a 0,9%, logo após o reimplante e 1 semana depois. No **grupo BSP (ZOL na superfície radicular)**, os dentes foram imersos em 10ml de ZOL (30 µM) por 10 minutos e os canais radiculares foram preenchidos com CAOH. Todos os dentes foram então reimplantados e os animais receberam dose única de 20.000 UI de penicilina G benzatina. A eutanásia foi realizada após 60 dias, para processamento histológico. As lâminas obtidas foram coradas pela hematoxilina e eosina para análise histológica e histométrica. Os resultados demonstraram que os grupos BSP e BC apresentaram menor comprometimento pela reabsorção radicular (reabsorção total) do que o grupo C. O grupo BSP apresentou também, menor comprometimento pela reabsorção inflamatória ($p < 0,05$). Pode-se concluir que uso do ZOL sobre a superfície radicular e

como curativo de canal foi mais favorável ao reparo do dente reimplantado e que o uso sistêmico não influenciou o reparo do dente reimplantado.

Palavras-chave: Reimplante dentário. Bisfosfonatos. Reabsorção radicular.

Figueiredo LR. Influence of sodium zoledronate on late dental reimplantation. Histometric study in rats [tese] – Araçatuba: São Paulo State University (Unesp); 2023.

ABSTRACT

The biggest challenge in cases of late dental reimplantation is root resorption, which can lead to loss of the reimplanted tooth. To this end, new research is looking for ways to control it and thus improve the prognosis of these teeth. Drugs such as bisphosphonates (BF), which have an antiresorptive effect on bone tissue, could also contribute to the control of root resorption after dental trauma. This study thus proposed to study the effect of zoledronic acid (ZOL) on the repair process of late reimplantation of rat teeth. For this purpose, 40 rats were used, with their right upper incisor extracted and kept in a dry environment for 60 minutes. The root surface was then cleaned with gauze soaked in saline solution and the teeth were divided into 4 groups of ten. In **group C (Control)**, the teeth were then immersed in 10ml of saline for 10 minutes, followed by removal of the pulp, filling of the canal with calcium hydroxide (CAOH) and creation of an apical “plug” with MTA cement. The time taken for endodontic treatment was 10 minutes. In the **BC group (ZOL as root canal dressing)**, the teeth were immersed in 10ml of saline for 10 minutes, and the root canals were filled with ZOL. In the **BSI (systemic ZOL)** group, the teeth were immersed in 10ml of saline for 10 minutes and the root canals were filled with CAOH. The animals received an intraperitoneal dose of ZOL at 100 µg/kg in 0.45 ml of 0.9% NaCl, immediately after reimplantation and 1 week later. In the **BSP group (ZOL on the root surface)**, teeth were immersed in 10ml of ZOL (30 µM) for 10 minutes and the root canals were filled with CAOH. All teeth were then reimplanted and the animals received a single dose of 20,000 IU of benzathine penicillin G. Euthanasia was performed after 60 days, for histological processing. The slides obtained were stained with hematoxylin and eosin for histological and histometric analysis. The results demonstrated that the BSP and BC groups presented less impairment due to root resorption (total resorption) than group C. The BSP group also presented less impairment due to inflammatory resorption ($p < 0.05$). It can be concluded that the use of ZOL on the root surface and as a root canal dressing was more favorable to the repair of the reimplanted tooth and that systemic use did not influence the repair of the reimplanted tooth.

Keywords: Dental reimplantation. Bisphosphonates. Root resorption.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Média em porcentagem e desvio-padrão da ocorrência de 30 ligamento periodontal (LP), ligamento periodontal reinserido (LPR) e anquilose (Anq.) nos grupos estudados.
- Tabela 2 - Média em porcentagem e desvio-padrão da ocorrência de 31 reabsorção inflamatória (R. Inf.), reabsorção por substituição (R.Subs.), reabsorção total (R. Total) nos grupos estudados.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Características histológicas dos grupos BSP, BSI, BC E C.	28
Figura 2 -	Incisivo superior direito após sindesmotomia	46
Figura 3 -	Luxação do incisivo superior direito	46
Figura 4 -	Extração do incisivo superior direito	47
Figura 5 -	Aspecto clínico do incisivo extraído	47
Figura 6 -	Dentes mantidos em bancada em meio seco por 60”	48
Figura 7 -	Limpeza do ligamento periodontal com gaze embebida em soro	48
Figura 8 -	Remoção da polpa radicular por via retrógrada	49
Figura 9 -	Irrigação com soro fisiológico	49
Figura 10 -	Preenchimento do conduto radicular com a medicação intracanal	50
Figura 11 -	Reimplante dentário	50
Figura 12 -	Dente reimplantado	51
Figura 13 -	Captura de corte transversal corado com HE	52
Figura 14 -	Mensuração área total de superfície radicular	52
Figura 15 -	Mensuração área total do evento analisado (Reabsorção, anquilose)	53
Figura 16 -	Obtenção dos valores para análises estatísticas	53

LISTA DE ABREVIATURAS

BF	Bisfosfonatos
CAOH	Hidróxido de cálcio
C	Controle
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
G	Gramas
HE	Hematoxilina-eosina
I.M.	Intra Muscular
ICSD	Incisivo central superior direito
LP	Ligamento Periodontal
mg/Kg	Miligramas por quilo
mL	Mililitros
mm	Milímetro
RI	Reimplante imediato
ZOL	Zolendronato de Sódio
µm	Micrometro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 PROPOSIÇÃO	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Experimento in vivo: Reimplante dentário em ratos	21
3.3.1 Animais	21
3.3.2 Anestesia dos animais	21
3.3.3 Indução da Avulsão dentária	21
3.3.4 Grupos experimentais e uso do ZOL	22
3.3.5 Indução do reimplante	23
3.3.6 Eutanásia e processamento histológico	23
3.3.7 Coloração Hematoxilina e Eosina	24
3.4 Análise histológica	24
3.5 Análise histométrica	24
3.6 Análise estatística	25
4 RESULTADOS	27
5 DISCUSSÃO	33
6 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	40
ANEXOS	46

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A avulsão dentária é definida por total deslocamento do elemento dental para fora do alvéolo, ocorrendo rompimento do feixe vículo-nervoso e exposição da superfície radicular e ligamento periodontal ao meio externo. Por esses motivos esse tipo de lesão é considerado uma das mais severas dentro do estudo das lesões de traumatismos dentoalveolares^{1,2}.

O tratamento mais indicado nesses casos é o Reimplante do elemento dental; reposicionando o dente em sua posição no alvéolo^{3,4}. Existem alguns fatores que influenciam no prognóstico do tratamento, sendo os mais importantes: Tempo extra-alveolar, meio de conservação utilizado e níveis de contaminação⁵. O tratamento proposto pode apresentar algumas consequências como anquilose e reabsorção radicular, sendo estas indesejadas, que frequentemente causam a perda do dente em até 5 anos⁶.

As células responsáveis pelas reabsorções óssea e dentária possuem grande semelhança no que diz respeito a morfologia e função. Por esse motivo, então, afirma-se que o processo de reabsorção destas estruturas é semelhante⁷. Considerando isso, drogas com função de inibir a reabsorção óssea poderiam também ser efetivas em casos de reabsorção dentária.

Os BF são agentes de baixo peso molecular formados a partir do ácido bisfosfônico, um análogo do pirofosfato em que dois átomos de fósforo são ligados por um átomo de carbono, que atuam se ligando à superfície do fosfato de cálcio⁸. Existe uma grande família de compostos BF que vêm sendo usados ou desenvolvidos para o tratamento de doenças ósseas que mostram atividade osteoclástica aumentada, tais como a doença de Paget⁹, complicações de metástases ósseas¹⁰, hipercalcemia de malignidade¹¹, e osteoporose^{12,13}.

Os efeitos dos BF ocorrem em três níveis: tecidual, celular e molecular¹⁴. No nível tecidual promove a redução do turnover ósseo, como se demonstrou com a utilização de marcadores bioquímicos. Os BF reduzem a extensão das regiões em reabsorção e a profundidade nas áreas erodidas^{15,16}. No nível celular os BF reduzem a atividade osteoclástica: a) pois inibem o recrutamento destas células para a superfície

óssea, b) inibe a atividade celular, c) reduz o tempo de vida celular pela indução a apoptose, d) e altera a troca mineral na forma físico-química.

A utilização deste medicamento para o tratamento de traumatismos dentários tem sido estudada sendo os mais utilizados os BF de segunda geração como o Alendronato de Sódio^{6,17-19}, e os de terceira geração, como o ácido Zoledronico^{20,21}.

A ação dos BF usados topicamente sobre a raiz já é conhecida em alguns estudos no traumatismo dentário¹⁸ e em outras situações^{19,22,23}, e inibem a reabsorção da raiz, uma vez que ligado à superfície pode inibir a ação dos odontoclastos^{18,24}. A afinidade dos BF pelo fosfato de cálcio e sua ligação preferencial com a hidroxiapatita nos ossos e dentes leva a uma rápida absorção pelos tecidos calcificados. A deposição dos BF é liberada de novo apenas após a reabsorção tecidual. Assim, o tratamento tópico com BF poderia ser efetivo por um período maior de tempo¹⁷. O conduto radicular também constitui importante via de administração de drogas para os casos de traumatismo dentários. A vantagem de utilizar a droga como curativo de canal seria obter um reservatório que poderia ser renovado periodicamente, proporcionando um período maior de proteção à raiz contra a reabsorção radicular⁸.

Existem poucos estudos relacionados ao uso do ZOL como curativo de canal e os resultados ainda não permitem uma definição de sua efetividade no traumatismo dentário.²⁵ A possibilidade de utilizar essa droga em períodos tardios do reparo de um dente reimplantado justifica o desenvolvimento de novos estudos.

Nada é sabido também sobre sua influência no traumatismo dentário quando utilizado na forma sistêmica. O ZOL, o mais potente dos bisfosfonatos, tem sido indicado para controle e tratamento de lesões neoplásicas e metástases ósseas²⁶. No entanto, doses baixas a moderadas de ZOL também são indicadas para o tratamento de osteoporoses²⁷. Tais condições têm se tornado cada vez mais frequente na atualidade, por conta de alguns hábitos e da maior expectativa de vida da população. Não é difícil que essa parcela da população seja acometida por traumatismo dentário e nada é sabido se haveria alguma influência no processo de reparo de um dente reimplantado.

Embora já existam trabalhos que demonstrem o efeito positivo do uso tópico dos BF no processo de reparo de determinadas condições de reimplante dentário, a literatura ainda carece de detalhes sobre como seria essa influência²⁵. Assim,

acreditamos ser oportuno a realização deste trabalho visando um maior esclarecimento sobre a melhor forma de emprego do ZOL.

Proposição

2 PROPOSIÇÃO

Objetivo geral

Avaliar o processo de reparo após o uso tópico ou sistêmico do ZOL no reimplante tardio de dentes de ratos.

Objetivo específico

Analisar histologicamente o processo de reparo do ligamento periodontal e ocorrência de reabsorções radiculares de dentes submetidos ao reimplante tardio, em ratos que receberam a administração tópica ou sistêmica do ZOL.

Materiais e métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Experimento *in vivo*: Reimplante dentário em ratos

Este trabalho foi realizado após sua metodologia ser analisada e aprovada pela Comissão de ética na experimentação animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba UNESP. (ANEXO A)

3.1.1 Animais

Para a realização deste trabalho foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus Wistar*) machos com peso corporal entre 250 e 300 gramas, divididos em quatro grupos com 10 animais cada. Os animais foram obtidos e mantidos no biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, durante todo o período do experimento, com ração sólida (Mogiana Alimentos S.A.) e água a vontade com exceção das 12 horas pré-operatórias onde o animal permanecerá em jejum. Nos 3 dias pós-operatórios a ração foi triturada.

3.1.2 Anestesia dos animais

Previamente à execução dos procedimentos experimentais os animais receberam como relaxante muscular a xilazina (10 mg/kg, Coopazine; Coopers, São Paulo, Brasil) e para a anestesia o cloridrato de quetamina (70 mg/kg, Vetanarcol; Laboratórios König, Buenos Aires, Argentina); ambas as drogas administradas por via intramuscular (I.M.).

3.3.3 Indução da Avulsão dentária

Realizada a antissepsia 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 foram mantidos em meio seco sobre bancada por um período de 60 minutos. Os dentes foram então limpos com gaze embebida em

soro fisiológico antes de receberem diferentes tipos de tratamento de acordo com cada grupo.

3.3.4 Grupos Experimentais e tratamento com Zoledronato de Sódio

Os 40 animais foram divididos em 4 grupos experimentais, com período de observação de 60 dias:

- **Grupo C – Controle:** No grupo C (Controle), os dentes foram imersos em 10ml de soro fisiológico por 10 minutos. Tiveram a papila dentária e o órgão do esmalte seccionados com lâmina de bisturi nº15 (EMBRAMAC Exp. E Imp) e a polpa removida por via retrógrada com auxílio de lima endodôntica tipo Kerr nº 25, ligeiramente curvada. Os canais foram irrigados com soro fisiológico e o líquido intracanal aspirado com seringa Luer Lock acoplada em agulha 25X6 (Injex, Ourinhos, São Paulo, Brasil) e secos com cones de papel absorvente (Dentsply, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil). Na sequência os canais foram preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio (Dentsply, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil) e propileno glicol, por via retrógrada, acondicionada em seringa Luer Lock de 1ml com agulha 25X6. O curativo foi posicionado respeitando-se o limite de 4mm aquém do ápice radicular. Na porção apical do canal e sobre o curativo de hidróxido de cálcio, foi confeccionado um “plug” com cimento MTA (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil) que preencheu os 4 mm apicais do canal radicular. O cimento foi obtido a partir da mistura de uma medida de pó com uma gota de água destilada, espatulado por 30 segundos até a homogeneização dos componentes, sendo posteriormente levado ao canal com espátula metálica e acamado com a ajuda de condensadores. O tempo decorrido para o tratamento endodôntico foi de 10 minutos.

- **Grupo BC – Zoledronato como medicação intracanal:** os dentes foram imersos em 10ml de soro fisiológico por 10 minutos e receberam o mesmo tratamento endodôntico do grupo C, porém os canais radiculares foram preenchidos com ZOL a 30 μ M (veiculado em carboximetilcelulose) (Farmácia de manipulação Aphoticário. Araçatuba, SP. Brasil).
- **Grupo BSI – Zoledronato como medicação sistêmica:** os dentes foram imersos em 10ml de soro fisiológico por 10 minutos e receberam o mesmo tratamento endodôntico do grupo C. Os animais receberam por via intraperitoneal, uma dose de

ZOL a 100 µg/Kg em 0,45 ml de NaCl a 0,9% (Sigma Chemical®, St. Louis, MO, USA) logo após o reimplante e outra 1 semana depois.

- **Grupo BSP – Zoledronato como tratamento de superfície radicular:** os dentes foram imersos em 10ml de ZOL a 30 µM (Sigma Chemical®, St. Louis, MO, USA) por 10 minutos e receberam o mesmo tratamento de endodôntico do grupo C.

3.3.5 Indução do Reimplante

Após o tratamento, os dentes extraídos 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. Após o reimplante, todos os animais receberam dose única de 20.000 U.I de penicilina G benzatina (Fontoura Wyeth S.A. – São Paulo – Brasil) por via intramuscular. Os animais foram acompanhados até se recuperarem da anestesia antes de retornarem ao biotério.

3.3.6 Eutanásia e processamento histológico

Após 60 dias a eutanásia dos animais ocorreu por meio de sobredosagem anestésica. 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 avaliado com o trauma. 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 álcoois 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. Ao final, foram alocadas em blocos de madeira para adaptação em micrótomo (Leica – Aristoplan, Alemanha), onde foram coletados os cortes histológicos do ICSD com 4 µm de espessura no sentido transversal, após para adaptação na lâmina histológica, foram colocados em banho-maria (40-50 °C) e recolhidos nas lâminas revestidas de poli-L-lisina, sendo dois cortes por lâmina com

diferença de 40 µm entre eles. Os cortes histológicos foram utilizados para a coloração no método de Hematoxilina-eosina (HE).

3.3.7 Coloração Hematoxilina e Eosina

Após a obtenção dos cortes, a parafina foi eliminada através do processo de desparafinização com xilol (em três banhos de xilol por 5, 10 e 15 minutos cada); hidratação com sequências decrescentes de álcool 90%, 70%, 50% e lavagem em tampão fosfato (PBS) 0,1 M, pH 7,4 (cada lavagem com duração de 10 minutos). As lâminas foram então imersas em solução de hematoxilina durante 3 minutos e lavadas com água corrente. Em seguida, imersas em eosina por 25 segundos e lavadas em água destilada. Posteriormente, após a secagem a temperatura ambiente, as lâminas foram montadas com meio de montagem (Entellan, Merckmillipore, HE, Alemanha) e lamínula de vidro.

3.4 Análise histológica

A análise histológica foi realizada com auxílio de microscópio óptico (Axiolab–Zeiss, Alemanha), e em função da anatomia, somente a face lingual da raiz foi considerada por conter o ligamento periodontal e a camada de cimento. Foram analisadas as características do ligamento periodontal, osso alveolar, cimento e dentina, além da ocorrência de reabsorção inflamatória, anquiose e reabsorção por substituição ao longo de toda superfície radicular.

3.5 Análise histométrica

O corte transversal foi capturado por meio de uma câmera AxioCam MRc5 (Carl Zeiss do Brasil LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) acoplada a um EstereomicroscópioStemi 2000 C (Carl Zeiss do Brasil LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) com um aumento de 1:25, permitindo uma visão panorâmica do dente. Essa imagem foi salva como figura no programa Axio Vision 4.5 (Carl Zeiss do Brasil LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) e utilizada para a quantificação no programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Para a análise das áreas de reabsorção radicular, inicialmente foi mensurada a área de toda a dentina radicular e em seguida a área de dentina radicular envolvida pela reabsorção inflamatória ou por substituição. Esses valores foram submetidos a uma regra de três para se obter a porcentagem de raiz comprometida pela reabsorção. A partir destes valores, foram calculadas as médias de cada grupo e aplicado o teste estatístico. As áreas de anquilose alvéolo-dentária e de ligamento periodontal foram mensuradas por meio do perímetro da superfície radicular. Inicialmente, foi mensurado o perímetro de toda a raiz e depois o perímetro das áreas que apresentavam anquilose ou ligamento periodontal. A partir de uma regra de três, foi calculado a porcentagem da extensão comprometida e aplicado o teste estatístico. Para a identificação e seleção das áreas de reabsorção, as imagens digitais obtidas foram comparadas com os cortes histológicos no microscópio óptico comum.

3.6 Análise estatística

Os valores absolutos foram submetidos à análise estatística, cujos cálculos foram realizados pelo software GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Softwares Incorporated, San Diego, USA). Inicialmente, os dados foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade. O teste de Kruskal-Wallis, para comparações múltiplas de dados não-paramétricos, foi utilizado para comparação das amostras com nível de significância $p < 5\%$. Quando evidenciada diferença estatisticamente significativa, o teste de Dunn foi utilizado para comparações individuais. (Tabelas 1 e 2)

Resultados

4 RESULTADOS

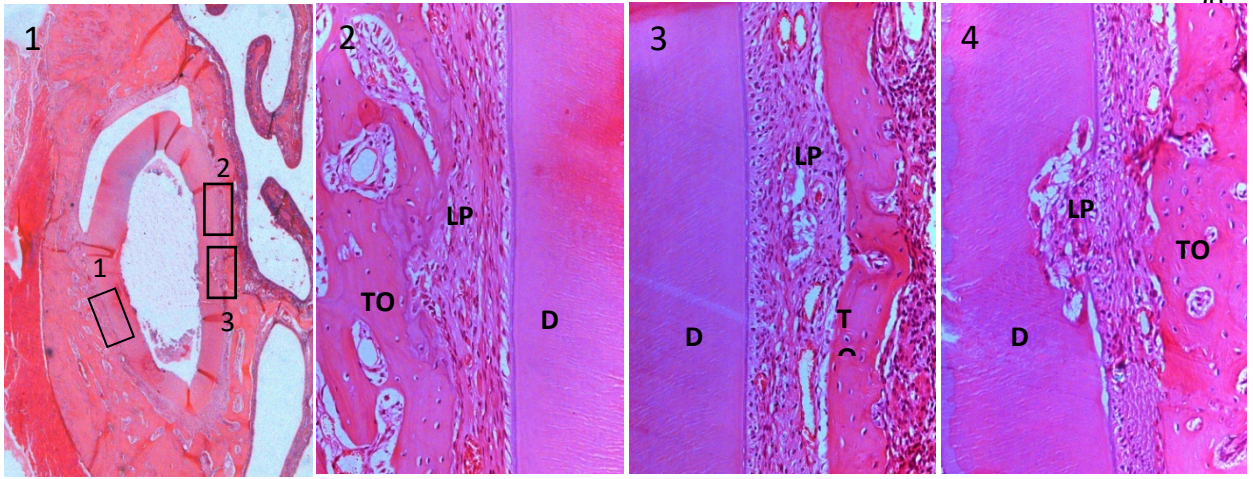
Análise histológica

Nesse estudo, todos os procedimentos experimentais seguiram as recomendações propostas pelo Comitê de ética no uso de animais (CEUA) e pode se observar que os animais suportaram adequadamente todos os procedimentos cirúrgicos. Por conta da fratura da raiz durante a exodontia, houve a necessidade de descartar 1 espécime dos grupos BC, e 2 espécimes dos grupos BSP, BSI e C.

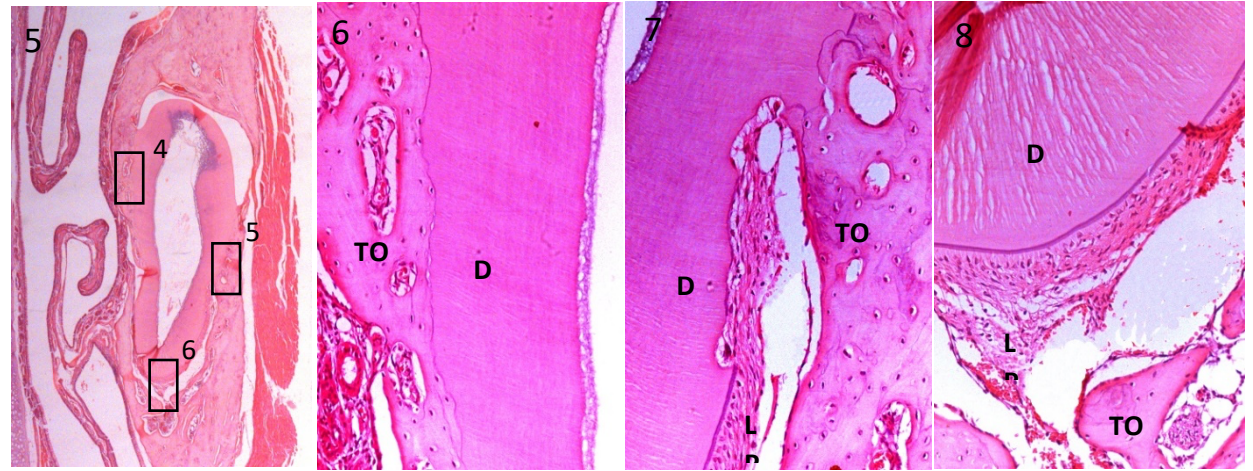
A superfície radicular dos espécimes de todos os grupos apresentava em proporções semelhantes (Tabela 1), um tecido conjuntivo fibroso rico em fibroblastos, fibras colágenas e vasos sanguíneos. As fibras colágenas desse tecido, na maior parte dos casos se apresentavam dispostas paralelamente à superfície radicular ou sem uma organização definida (Fig. 1-1, 1-2, 1-8 e 1-11). Em várias áreas, havia um estreitamento do espaço do LP que se apresentava parcialmente ocupado por tecido ósseo alveolar (Fig. 1-1, 1-5, 1-8, 1-11). Neste tecido um infiltrado inflamatório de leve a moderada intensidade foi encontrado em vários pontos. Pequenas áreas de reinsertão foram encontradas em todos os grupos, mas em poucos espécimes (BSP= 3, BSI= 1, BC= 4 e C = 4 espécimes). Caracterizavam-se pela presença de fibras colágenas organizadas e reinsertadas no cimento e no tecido ósseo alveolar (Fig. 1-6, 1-9). Áreas de anquilose foram encontradas em todos os grupos e se caracterizavam pela presença de tecido ósseo alveolar recobrendo a superfície radicular, que em alguns casos, estava comprometida pela reabsorção (Fig1-4, 1-7, 1-10). Áreas de reabsorção radicular também foram encontradas em todos os espécimes. Nos grupos BSP e BC esse comprometimento foi menor do que o encontrado no grupo C ($p < 0,05$). No grupo BC esse comprometimento também se apresentou menor do que o observado no grupo BSI ($p < 0,05$) (Tabela 2). Dessas áreas, a reabsorção inflamatória estava presente em 6 espécimes do grupo BSP, 7 do grupo BSI e em todos dos grupos BC e C (Fig 1-11, 1-12). Nas áreas reabsorvidas, o tecido conjuntivo fibroso apresenta um infiltrado inflamatório de linfócitos, histiócitos e em alguns casos polimorfonucleares neutrófilos. Em vários pontos foram observados clastos junto à parede dentinária reabsorvida (Figura 1-3, 1-5, 1-11, 1-12). A extensão de dentina comprometida pela reabsorção inflamatória foi menor no grupo BSP em relação ao grupo C ($p < 0,05$). As áreas de reabsorção por substituição caracterizavam-se pela

presença de tecido ósseo alveolar reparando a dentina previamente reabsorvida. Com exceção de 2 espécimes dos grupos BSP e BSI, e 3 do grupo C, todos os demais apresentaram algum comprometimento por esse tipo de reabsorção. Geralmente, apresentavam pouca profundidade (Fig. 1-4, 1-7, 1-10, 1-12). A parede óssea alveolar era formada por tecido ósseo maduro, com osteoblastos em sua periferia. Eventuais pontos de reabsorção foram observados

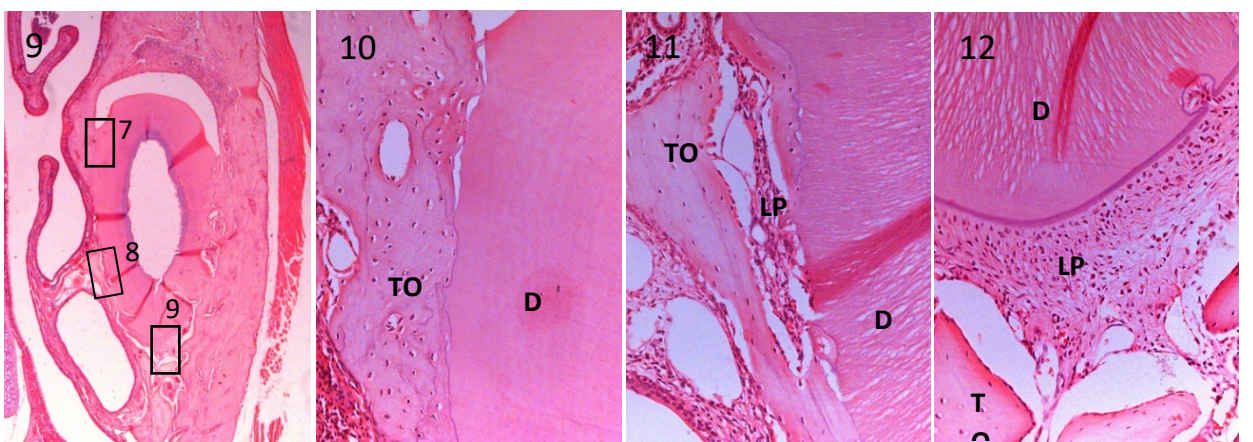
Grupo BSP



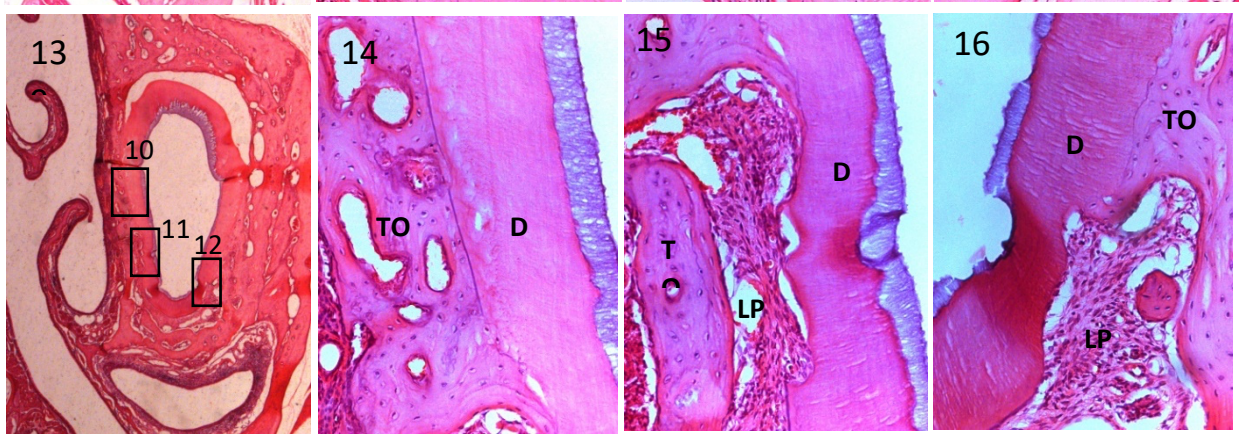
Grupo BSI



Grupo BC



Grupo C



Fonte: Autor, 2023

Grupo. BSP – Fig. 1 - 4. LP reparado com fibras colágenas dispostas paralelamente à superfície radicular; espaço do LP com estreitamento pela formação de tecido ósseo alveolar; área de LP reparado com fibras colágenas sem uma organização definida; área de reabsorção radicular inflamatória; infiltrado inflamatório crônico no tecido conjuntivo fibroso com a presença de clastos junto à dentina reabsorvida. **Grupo. BSI – Fig. 5 - 8.** Reabsorção radicular por substituição comprometendo extensa área da superfície radicular; área de reabsorção radicular ativa; presença de clastos junto à dentina reabsorvida; área de integridade do cemento reparado por ligamento periodontal organizado, com reinserção das fibras colágenas. **Grupo. BC – 9 - 12.** Área de reabsorção por substituição comprometendo a camada superficial da raiz; área de estreitamento do espaço do LP pela presença de tecido ósseo alveolar; LP reparado com fibras colágenas reinseridas na camada de cemento e superfície óssea alveolar. **Grupo. C – Fig. 13 - 16.** Integridade da camada de cemento reparado por LP com fibras colágenas dispostas paralelamente à superfície radicular; áreas de reabsorção radicular comprometendo a camada mais profunda da dentina; reabsorção radicular cessada e reparada por fibras do LP. Comprometimento mais superficial da raiz.

Análise histométrica

Tabela 1 - Média em porcentagem e desvio-padrão da ocorrência de ligamento periodontal (LP), ligamento periodontal reinserido (LPR) e anquilose (Anq.) nos grupos estudados.

Evento	BSP (n=8)	BSI(n=8)	BC(n=9)	C(N=8)	p
LP	32,41(17,45)	31,01(17,67)	36,27(21,7)	31,49(11,9)	0,8059
LPR	1,3(2,89)	0,68(1,94)	1,19(2,98)	4,33(9,13)	0,6785
Anq.	35,86(17,47)	28,62(21,79)	28,22(19,11)	36,98(17,57)	0,2257

n: número de espécimes por grupo. Teste de Dunn para comparações entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante*

Tabela 2 - Média em porcentagem e desvio-padrão da ocorrência de reabsorção inflamatória (R. Inf.), reabsorção por substituição (R.Subs.), reabsorção total (R. Total) nos grupos estudados.

Evento	BSP (n=8)	BSI (n=8)	BC (n=9)	C (n=8)	p
R. Inf.	1,86(2,92) ^a	5,21(6,81) ^{ab}	4,25(5,90) ^{ab}	11,37(10,95) ^b	0,0014*
R. Subs.	1,1(2,3)	3,35(4,17)	2,07(2,28)	4,89(5,27)	0,0524
R. Total	2,92(4,11) ^a	9,01(7,12) ^{bc}	6,32(7,25) ^{ab}	16,27(10,86) ^c	0,0001*

n: numero de espécimes por grupo. Teste de Dunn para comparações entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante*.

Discussão

5 DISCUSSÃO

Já demonstrado por outros autores, a metodologia empregada neste trabalho tem se mostrado adequado para o estudo do processo de reparo em reimplante dentário^{6,28}. Diferente dos humanos, os incisivos destes animais possuem crescimento contínuo o que poderia interferir na análise dos resultados. No entanto, com a remoção da papila dental e do órgão do esmalte existe a paralização desse crescimento²⁹ permitindo uma comparação mais adequada.

Nesse estudo, optou-se por manter o dente avulsionado em meio seco por 60 minutos por representar uma condição comum na prática clínica e um grande desafio aos pesquisadores que buscam o controle da reabsorção radicular. Nessa condição podemos ter células viáveis do LP mas comprometidas, além do comprometimento do tecido pulpar.^{1,3} Essas estruturas são submetidas à contaminação pelo contato com a saliva ou pela manipulação extrabucal da raiz, podendo desencadear uma reabsorção radicular externa associada à infecção³⁰. Se a área lesada pela inflamação for de pequena extensão e se novos estímulos inflamatórios não ocorrerem, será possível o reparo dessa área por novo LP, a partir de células viáveis adjacentes. Mas se a área for extensa, haverá o reparo por tecido ósseo ficando susceptível à reabsorção por substituição³¹.

Os achados histológicos em todos os grupos corroboram tais condições e foram caracterizados pela baixa extensão da superfície radicular reparadas por LP e poucas áreas de reinserção de suas fibras.

O tratamento endodôntico, antibioticoterapia sistêmica³⁰ e a limpeza da superfície radicular são condutas indicadas para minimizar os efeitos da reabsorção radicular associada a infecção¹. Adicionalmente, a medicação intracanal com CAO, agrega algumas propriedades desejáveis para esse fim, como a ação sobre as bactérias e suas enzimas na parede do canal e nos túbulos dentinários, produzindo um efeito antimicrobiano. Também possui ação proteolítica sobre os remanescentes de tecido pulpar das paredes do conduto radicular³².

No grupo BC, o uso do ZOL como curativo de canal resultou em redução nas áreas de reabsorção radicular. Outros autores também estudaram essa estratégia de tratamento utilizando o etidronato⁸ e o alendronato,⁶ mas sem resultados positivos. É possível que a potência da droga tenha contribuído para o resultado deste estudo,

pois o ZOL, um bisfosfonato de terceira geração, é dez mil vezes mais potente do que as drogas já empregadas³³.

Assim como no caso do CAOH, a sua efetividade dependeria da difusão pelos túbulos dentinários para alcançar a superfície radicular onde se instala a reabsorção radicular externa.⁸ Não existem estudos que determinem como isso ocorreria e qual a dificuldade dessa droga em se difundir pelos túbulos dentinários, mas os resultados encontrados sugerem essa possibilidade.

Pode-se observar nos resultados que não houve diferença significativa na ocorrência de reabsorção inflamatória entre o grupo BC e os demais grupos que receberam hidróxido de cálcio. Porém, não existem relatos na literatura de algum efeito antimicrobiano do ZOL como curativo de canal em um dente reimplantado, semelhante ao observado no CAOH no controle da reabsorção inflamatória. Foi demonstrado *in vitro* que o ibandronato, o pamidronato e o ZOL possuem efeito antimicrobiano sobre algumas espécies gram positivas, gram negativas e anaeróbicas presentes em lesões de osteonecrose de mandibular relacionada a medicamentos. A maior efetividade do ZOL estava relacionada a concentrações que variavam de 100µg/ml a 400 µg/ml³⁴. Ainda assim, acreditamos ser necessário novos estudos para verificar se essa ação antimicrobiana ocorreria com o ZOL como curativo de canal. É possível inferir, no entanto, que os cuidados com a antisepsia durante os procedimentos de exodontia e reimplante, manutenção no dente em meio seco, remoção do tecido pulpar e limpeza do conduto radicular, além do uso sistêmico do antibiótico tenham contribuído para esse resultado.

Uma vez que o ZOL se apresenta na forma líquida, utilizamos a carboximetilcelulose para a obtenção de um gel que promovesse a liberação lenta da droga prolongando seu período de ação. O carboximetilcelulose é um biopolímero aniônico solúvel em água. Possui características como hidrofiliabilidade, bioadesividade, sensibilidade ao pH, não toxicidade e capacidade de formação de gel³³. Por essas propriedades, tem sido utilizado como sistema de liberação continuada de medicamentos.³⁵ Mesmo no traumatismo dentário já foi empregado como veículo na formulação de curativo de canal sem que houvesse interferência na difusão da droga utilizada³⁶. Adicionalmente, o plug apical de MTA foi confeccionado para evitar o escoamento do curativo pelo forame apical que é amplo, característico desse tipo de animal. A concentração empregada neste estudo se baseou em outros autores que

demonstraram sua efetividade quando utilizado na superfície radicular³⁶. Porém, não existe definição para a concentração ideal para esse tipo de aplicação no traumatismo dentário.^{6,8}

O uso sistêmico do ZOL não influenciou no reparo dos dentes reimplantados. A concentração empregada neste estudo é compatível com a utilizada na terapia oncológica em humanos e foi adaptada para uso em ratos³⁷. Em modelo de estudo para indução de osteonecrose de mandíbula após uso de bisfosfonatos, os autores empregaram 3 doses (1 por semana), 6 semanas antes da exodontia³⁷. Assim optamos por 2 doses (1 por semana) administradas a partir do primeiro dia após o reimplante para analisar sua influência na reabsorção radicular. Doses com maior concentração e mais frequentes poderiam resultar em transtorno no reparo do tecido ósseo alveolar³⁸.

Foi demonstrado que o ZOL é prontamente disponibilizado aos tecidos após a sua infusão³⁹. Após a administração intravenosa, os BF desaparecem do plasma rapidamente, com uma meia-vida de 1-2 h. Por outro lado, uma vez ligado ao osso, eles só são liberados quando o tecido ósseo, ao qual estão ligados, sofre reabsorção³³. Nos ossos, seu efeito é mantido por alguns anos mesmo após cessar o seu uso^{40,41}. Isso permite inferir que o mesmo estaria presente no reparo do dente reimplantado no período analisado. No entanto é possível que a concentração disponibilizada localmente não tenha sido suficiente para promover algum efeito na superfície radicular, como ocorreu no grupo BSP.

Nesse estudo o emprego do ZOL na superfície radicular também resultou em menor comprometimento pela reabsorção radicular do que o grupo C. Resultados favoráveis também foram encontrados em outros estudos com o uso do alendronato^{13,17,18,19,28}, e do zoledronato^{42,43}. A redução nas áreas de reabsorção seria consequente de um efeito local com diminuição no recrutamento e atividade dos clastos, além de aumento de apoptose dessas células^{15,16}. Esses resultados foram encontrados com o ZOL a 1 μM ,⁴² 1,48 μM ,¹³ 20 μM e 40 μM ,⁴³ e segundo Yoo et al.⁴³ os melhores resultados foram encontrados com concentração superior a 20 μM . Ainda assim, parece não haver um consenso sobre a concentração ideal. A literatura relata também que para soluções acima de 1 μM , havia o risco de apoptose e de interferência na capacidade de proliferação dos fibroblastos⁴⁴. Nesse estudo, apesar da

concentração empregada, não foi possível determinar essa influência pois não houve diferença significativa na ocorrência de anquilose e na extensão de LP.

No grupo BSP, a redução nas áreas de reabsorção ocorreu principalmente na reabsorção inflamatória, sem alteração nas áreas de reabsorção por substituição. Isso também foi observado por outros autores^{13,43} e para Choi et al.¹³, isso seria consequente de uma ação anti-inflamatória do ZOL na superfície radicular.

Pode-se notar também que em várias áreas de todos os grupos, o LP era formado por tecido conjuntivo fibroso cujas fibras não apresentavam uma organização definida ou estavam dispostas paralelamente a superfície radicular. Segundo a literatura, essa característica indicaria uma tendência a formação da anquilose⁴⁵. Isso ocorreria por conta da exposição do dente avulsionado ao meio seco que leva à perda dos restos epiteliais de Malassez que são responsáveis pela manutenção do LP⁴⁶.

Devido à semelhança entre a morfologia, propriedades enzimáticas e as funções das células que reabsorvem a dentina, cimento e tecido ósseo, pode-se considerar que os processos de reabsorção dentária e óssea sejam semelhantes⁷. Portanto, fármacos que inibem a reabsorção óssea poderiam também ser efetivos nos casos de reabsorção dentária. São poucos os estudos sobre as diversas formas de uso dos bisfosfonatos no traumatismo dentário o que dificulta uma abordagem mais adequada nos casos de traumatismo dentário. Esse trabalho busca contribuir para esse entendimento, porém acreditamos ser necessário mais estudos para melhor aproveitar seus benefícios.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada neste estudo pode-se concluir que o uso sistêmico do ZOL não influenciou no reparo dos dentes reimplantados. O uso do ZOL na superfície radicular assim como curativo de canal proporcionou menor comprometimento da raiz pela reabsorção radicular apresentando-se como opção de tratamento para dentes que são reimplantados com o LP comprometido.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Fouad AF, Abbott PV, Tsilingaridis G, et al. International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2. Avulsion of permanent teeth [published online ahead of print, 2020 May 27]. *Dent Traumatol*. 2020. <https://doi.org/10.1111/edt.12573>.
2. Andreasen JO, Andreasen FM. Avulsions. In: Andreasen JO, Andreasen FM, Andersson L, editors. *Textbook and color atlas of traumatic injuries to the teeth*, 4th edn. Oxford, UK: Wiley- Blackwell; 2007. p. 444–88.
3. Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 4. Factors related to periodontal ligament healing. *Endod Dent Traumatol* 1995;11:76–89.
4. ANDREASEN, J. O.; BORUM, M. K.; JACOBSEN, H. L.; ANDREASEN, F. M. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 1. Diagnosis of healing complications. *Endod. Dent. Traumatol.*, v. 11, n. 2, p. 51-58, Apr. 1995.
5. Poi Wr, Sonoda Ck, Martins Cm, Melo Me, Pellizzer Ep, De Mendonça Mr, et al. Storage media for avulsed teeth: a literature review. *Braz Dent J* 2013;24:437-45.
6. Mori GG, Garcia RB, Gomes de Moraes I, Bramante CM, Bernardineli N. Morphometric and microscopic evaluation of the effect of a solution of alendronate as an intracanal therapeutic agent in rat teeth submitted to late reimplantation. *Dent Traumatol* 2007; 23:218–21.
7. Rodan GA, Martin TJ. Role of the osteoblast in hormonal control of bone resorption – a hypothesis. *Calcif Tissue Res*. 1981;33:349-51.
8. Thong YL, Messer HH, Zain RB, Saw LH, Yoong LT. Intracanal bisphosphonate does not inhibit replacement resorption associated with delayed replantation of monkey incisors. *Dent Traumatol* 2009;25:386–93.
9. Kotowicz MA. Paget disease of bone. Diagnosis and indications for treatment. *Aust Fam Physician*. 2004 Mar;33(3):127-31.
10. Keizman D, Ish-Shalom M, Pili R, Hammers H, Eisenberger MA, Sinibaldi V et al. Bisphosphonates combined with sunitinib may improve the response rate,

- progression free survival and overall survival of patients with bone metastases from renal cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 2012 May;48(7):1031-7.
11. Auron A, Tal L, Srivastava T, Alon US. Reversal of hypercalcemic acute kidney injury by treatment with intravenous bisphosphonates. *Pediatr Nephrol*. 2009 Mar;24(3):613-7.
 12. Khosla S, Bilezikian JP, Dempster DW, Lewiecki EM, Miller PD, Neer RM et al. Benefits and Risks of Bisphosphonate Therapy for Osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Apr 20.
 13. Choi SC, Kwon YD, Kim KC, Kim GT. The effects of topical application of bisphosphonates on replanted rat molars. *Dent Traumatol*. 2010; 26: 476–80.
 14. Rodan GA, Martin TJ. Mechanisms of action of bisphosphonates. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1998; 38: 375-88.
 15. Boyce RW et al. The effects of risedronate on canine cancellous bone remodeling: three-dimensional Kinetic reconstruction of the remodeling site. *J Bone Miner Res*. 1995; 10:211-21.
 16. Ott SM. Clinical effects of bisphosphonates in involutional osteoporosis. *J Bone Miner*. 1993; res8 suppl.2: 597-606.
 17. Komatsu K, Shimada A, Shibata T, Shimoda S, Oida S, Kawasaki K et al. Long-term effects of local pretreatment with alendronate on healing of replanted rat teeth. *J Periodontal Res*. 2008;43:194–200
 18. Levin L, Bryson EC, Caplan D, Trope M. Effect of topical alendronate on root resorption of dried replanted dog teeth. *Dent Traumatol* 2001; 17: 120–6.
 19. Shibata T, Komatsu K, Shimada A et al. Effects of alendronate on restoration of biomechanical properties of periodontium in replanted rat molars. *J Periodont Res*. 2004; 39:405–414.
 20. Reddy, G.T.; Kumar, T.M.; Veena. Formulation and evaluation of alendronate sodium gel for treatment of bone resorptive lesions in periodontitis. *Drug Del*. 2005;12:217-22.
 21. Parfitt, J. M.; Driman, D.K. Pathological effects of drugs on the gastrointestinal tract: a review. *Hum. Pathol*. 2007;38:527-36.
 22. Igarashi K, Adachi H, Mitani H, Shinoda H. Inhibitory effect of the topical administration of a bisphosphonate (risedronate) on root resorption incident to orthodontic tooth movement in rats. *J Dent Res* 1996;75:1644–1649.

23. Liu L, Igarashi K, Haruyama N, Saeki S, Shinoda H, Mitani H. Effects of local administration of clodronate on orthodontic tooth movement and root resorption in rats. *Eur J Orthod* 2004;26:469–473.
24. Sato M, Grasser W, Endo N et al. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest* 1991;88:2095–2105.
25. Najeeb S, Siddiqui F, Khurshid Z, Zohaib S. Effect of bisphosphonates on root resorption after tooth replantation - a systematic review. *Dent Traumatol*. 2017 Apr;33(2):77-83
26. Compston, J., Cooper, A., Cooper, C., Gittoes, N., Gregson, C., Harvey, N., Hope, S., Kanis, J. A., McCloskey, E. V., Poole, K., Reid, D. M., Selby, P., Thompson, F., Thurston, A., Vine, N., & National Osteoporosis Guideline Group (NOGG) (2017). UK clinical guideline for the prevention and treatment of osteoporosis. *Archives of osteoporosis*, 12(1), 43.
27. EASTELL, Richard; WALSH, Jennifer S.; WATTS, Nelson B.; SIRIS, Ethel. Bisphosphonates for postmenopausal osteoporosis. *Bone*, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 82-88, jul. 2011. Elsevier BV. 36 Foster, H. L.; Small, J. D.; Fox, J. G. The mouse in biomedical research. New York, NY: Academic Press, 1982. 466 p.
28. Lustosa-Pereira A, Garcia RB, de Moraes IG, Bernardineli N, Bramante CM, Bortoluzzi EA. Evaluation of the topical effect of alendronate on the root surface of extracted and replanted teeth. Microscopic analysis on rats' teeth. *Dent Traumatol*, 2006;22:30–5.
29. Merzel J, Novaes PD. Development of functional dentin incisors after a partial resection of the odontogenic organ of rat incisors. *Arch Oral Biol*. 2006, 51:825-35.
30. Andreassen JO: Relationship between surface and inflammatory resorption and changes in the pulp after replantation of permanent incisors in monkeys. *J Endod* 7:294-301.
31. Andreasen JO. Relationship between cell damage in the periodontal ligament after replant or removal of the periodontal ligament. Periodontal healing after replantation of mature permanente incisors in monkeys. *Acta Odont Scand*. 1981;39:15–25.

32. Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Júnior O. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J* 1995;6:85–90.
33. Lin, J. H. Bisphosphonates: A Review of Their Pharmacokinetic Properties *Bone*. v.18, p.75-85, 1996.
34. Ermer MA, Kottmann SC 2, Otten JE, Wittmer A, Poxleitner P, Pelz K. In Vitro Investigation of the Antimicrobial Effect of Three Bisphosphonates Against Different Bacterial Strains. *J Oral Maxillofac Surg*. 2018 Mar;76(3):553-560.
35. Javanbakht S, Shaabani A. Carboxymethyl cellulose-based oral delivery systems. Review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.133, p:21-29, 2019.
36. Matos FS, do Prado RF, Khoury RD, de Oliveira LD, Valera MC, Tomson PL, Carvalho CAT. Anti-inflammatory and anti-resorptive efficacy of adrenergic blockers on late replanted rat incisors. *Dent Traumatol*. 2020 Jun;36(3):253-263.
37. Silva PGB, Ferreira-Junior AEC, Teófilo CR, Barbosa MC, Lima Júnior RCP, Sousa FB, Mota MR, Ribeiro RA, Alves APNN, Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. *Arch Oral Biol*. 2015 Sep;60(9):1237-45.
38. Kozutsumi R, Kuroshima S, Kaneko H, Sasaki M, Ishisaki A, Sawase T. Zoledronic acid deteriorates soft and hard tissue healing of murine tooth extraction sockets in a dose-dependent manner. *Calcified Tissue International*, v.110, n.1, p.104-116, 2022.
39. Scheper MA, Badros Z, Salama AR, Warburton G, Cullen KJ, Weikel DS, Meiller TF. A novel bioassay model to determine clinically significant bisphosphonate levels. *Support Care Cancer*. v.17. p:1553–1557, 2009.
40. COMPSTON, J, Cooper A, Cooper C, *et al*. UK clinical guideline for the prevention and treatment of osteoporosis. *Archives of Osteoporosis*, v.12, n.1, p.43, 2017.
41. KANIS, J.A. *et al*. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in post menopausal women. *Osteoporosis International*, v.30, n.1, p.3-44, 2019.

42. Mori GG, Janjacom DM, Nunes DC, Castilho LR. Effect of zoledronic acid used in the root surface treatment of late replanted teeth: a study in rats. *Braz Dent J* 2010; 21:452–7.
43. Yoo JE, Kim MS, Kwon YD, Kim EC, Kim KC, Choi SC. Could zoledronic acid prevent root resorption in replanted rat molar? *Dent Traumatol* 2015;31:465–7
44. Scheper MA, Badros A, Chaisuparat R, Cullen KJ, Meiller TF. Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Br J Haematol* 144:667–676. 2009.
45. Andreasen, JO. Analysis of pathogenesis and topography of replacement root resorption (ankylosis) after replantation of mature permanent incisors in monkeys *Swed Dent J* . 1980;4(6):231-40.
46. Løe H, Waerhaug J. Experimental replantation of teeth in dogs and monkeys. *Arch Oral Biol* 1961;3:176–84.

Anexos

ANEXOS

ANEXO A - APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Reimplante dentário após o uso do bisfosfonato. Estudo histométrico em ratos", Processo FOA nº 0801-2021, sob responsabilidade de Celso Koogi Sonoda apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 17 de Dezembro de 2021.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 28 de Junho de 2023.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 28 de Julho de 2023.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Tooth replantation after use of bisphosphonate. Histometric study in rats", Protocol FOA nº 0801-2021, under the supervision of Celso Koogi Sonoda presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on December 17, 2021.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: June 28, 2023.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: July 28, 2023.

Prof. Associado João Carlos Callera
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.foa@unesp.br

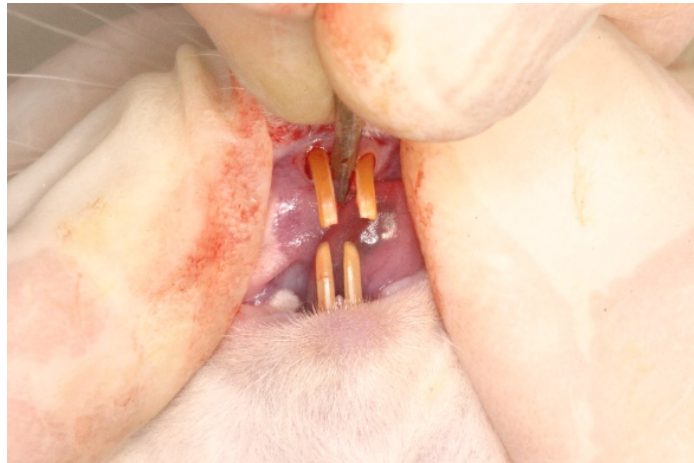
ANEXO B – FOTOS DOS PROCEDIMENTOS CIRURGICOS

Figura 2 – Incisivo superior direito após sindesmotomia



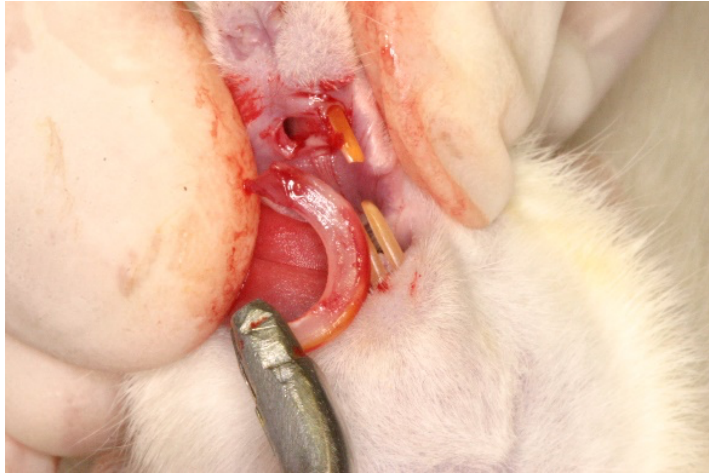
Fonte: Autor, 2023

Figura 3 - Luxação do incisivo superior direito



Fonte: Autor, 2023

Figura 4 - Extração do incisivo superior direito



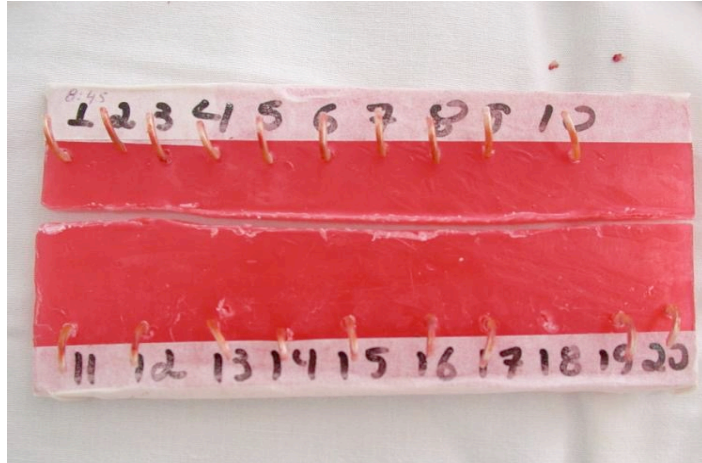
Fonte: Autor, 2023

Figura 5 - Aspecto clínico do incisivo extraído.



Fonte: Autor, 2023

Figura 6 - Dentes mantidos em bancada em meio seco por 60”.



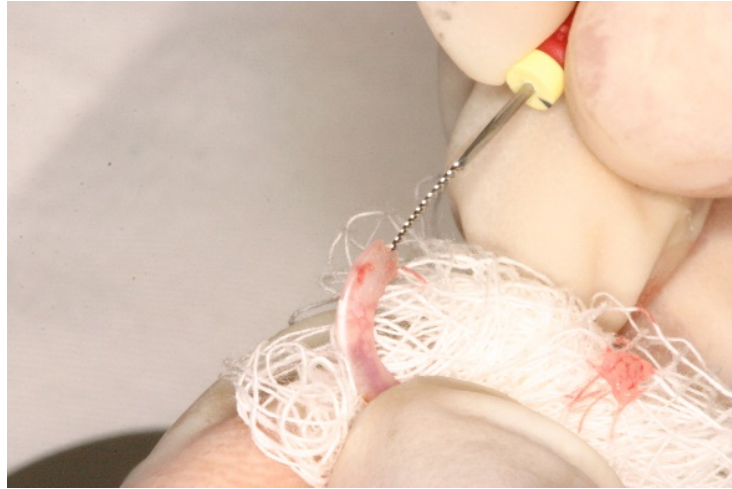
Fonte: Autor, 2023

Figura 7 - Limpeza do ligamento periodontal com gaze embebida em soro fisiológico



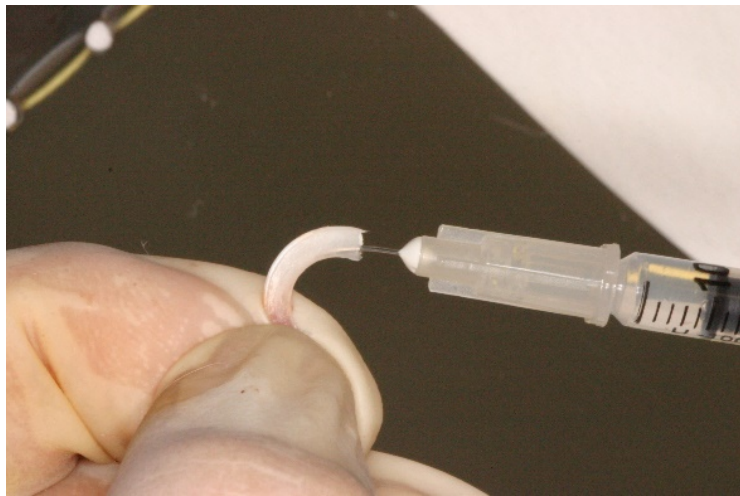
Fonte: Autor, 2023

Figura 8 - Remoção da polpa radicular por via retrógrada



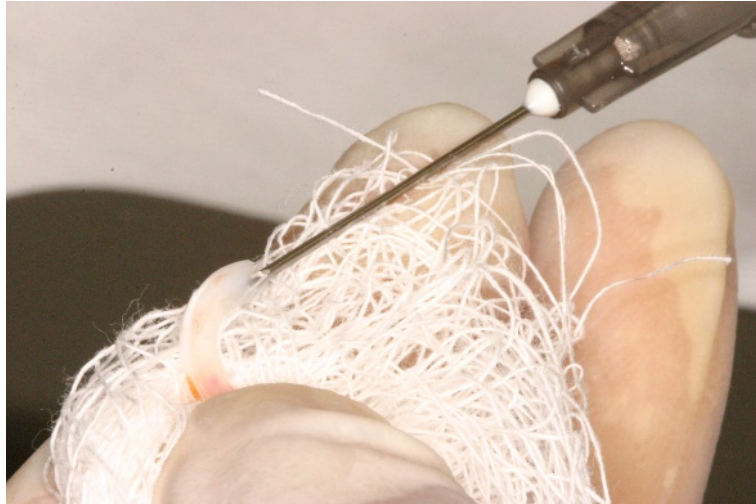
Fonte: Autor, 2023

Figura 9 - Irrigação com soro fisiológico



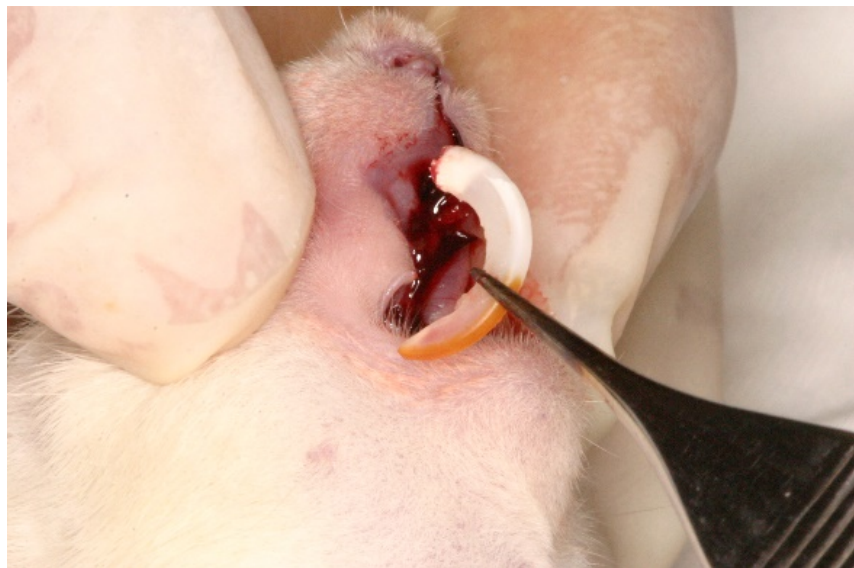
Fonte: Autor, 2023

Figura 10 - Preenchimento do conduto radicular com a medicação intracanal



Fonte: Autor, 2023

Figura 11 - Reimplante dentário



Fonte: Autor, 2023

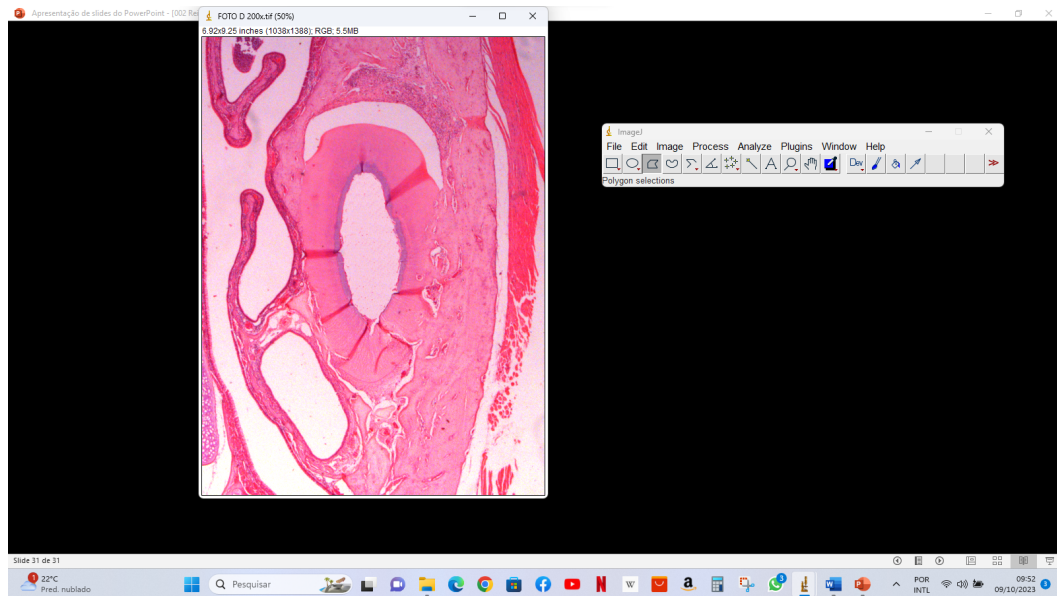
Figura 12 - Dente reimplantado



Fonte: Autor, 2023

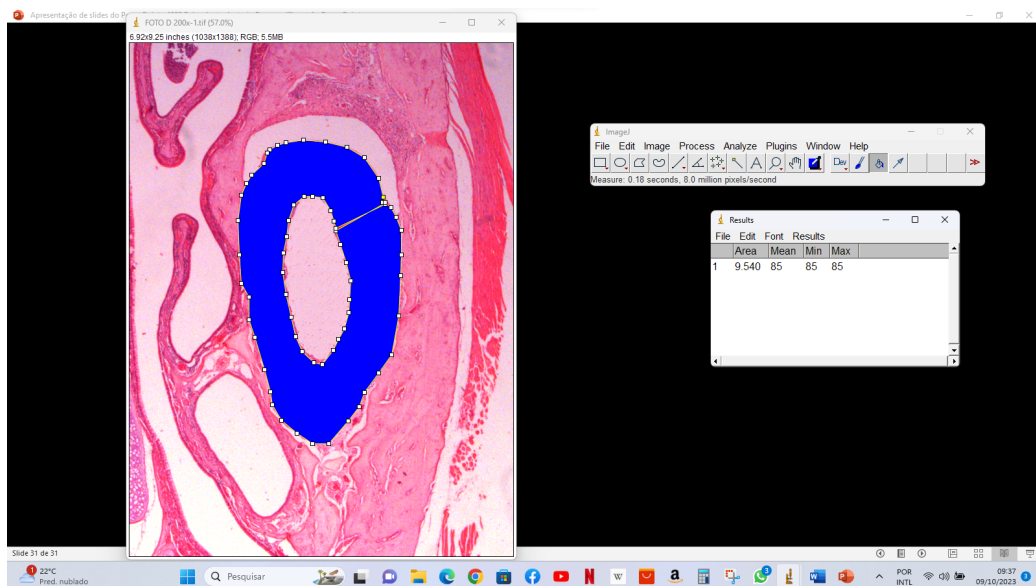
ANEXO C – MENSURAÇÃO PARA OBTENÇÃO DOS VALORES ARA HISTOMETRIA

Figura 13 – Captura de corte transversal corado com HE



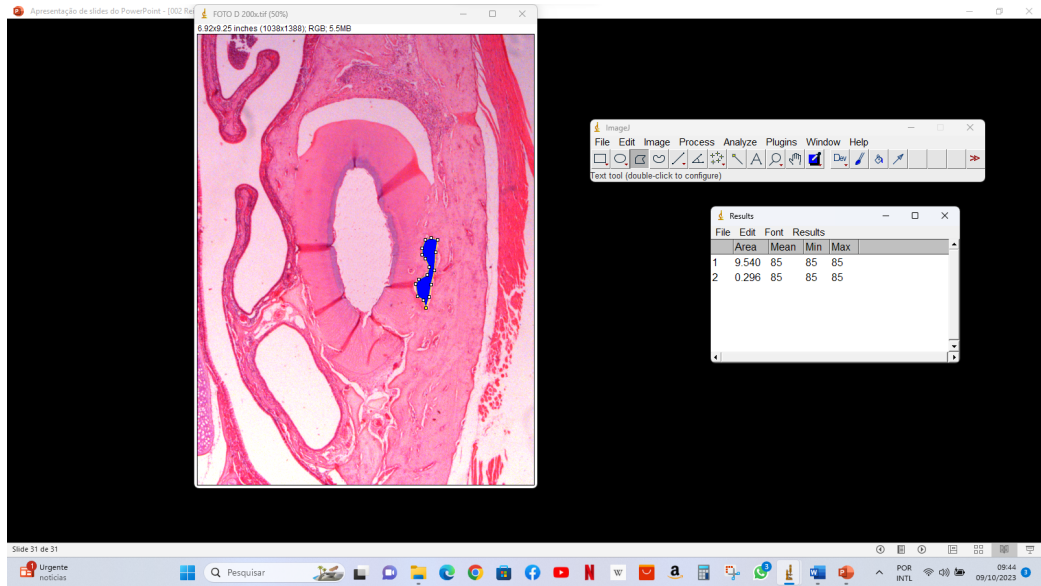
Fonte: Autor, 2023

Figura 14 – Mensuração área total de superfície radicular



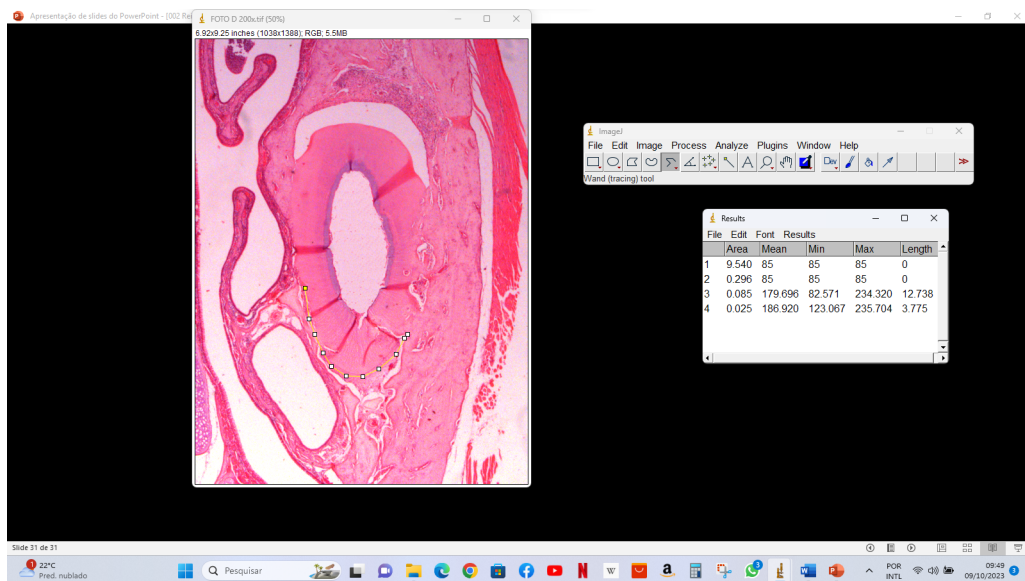
Fonte: Autor, 2023

Figura 15 – Mensuração área total do evento analisado (Reabsorção, anquilose)



Fonte: Autor, 2023

Figura 16 – Obtenção dos valores para análises estatísticas



Fonte: Autor, 2023