

Ana Paula Simões Corrêa

**Análise histomorfométrica do processo de reparo
após o reimplante de dentes de rato mantidos em
soro do leite bovino e leite integral**

Ana Paula Simões Corrêa

**Análise histomorfométrica do processo de reparo após
o reimplante de dentes de rato mantidos em soro do
leite bovino e leite integral**

Dissertação apresentada à faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Unesp, para a obtenção do Grau de “Mestre em Odontologia” – Área de concentração Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Roberto Poi

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

C824a	Corrêa, Ana Paula Simões. Análise histomorfométrica do processo de reparo após o reimplante de dentes de rato mantidos em soro do leite bovino e integral / Ana Paula Simões Corrêa. – Araçatuba, 2014 79 f. : il; tab.+ 1 CD-ROM Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba Orientador: Prof. Wilson Roberto Poi 1. Avulsão dentária 2. Reimplante dentário 3. Leite I. T. Black D7 CDD 617.64
-------	--



Dedicatória

Dedicatória

A Deus,

Por ser a inteligência suprema e causa primária de todas as coisas.

Onipresente, Onipotente, Onisciente...

Aos Meus Pais e Irmã,

Ana Flávia Simões Corrêa, Paulo Sérgio de Miranda Corrêa (in memoriam) e Jéssica Maria Simões Corrêa por todo o amor, carinho, compreensão, confiança e dedicação. A minha mãe por ser mãe e pai. A minha irmã por sua compreensão e companheirismo. Aos meus pais e irmã por serem as pessoas que mais amo nesse mundo.

Amo muito vocês incondicionalmente...



Agradecimentos Especiais

Agradecimentos Especiais

Ao Meu Orientador Wilson Roberto Poi,

Foram menos de 02 anos de convivência, porém anos de minha vida que tornaram-se épicos. Épicos? – Sim: imortais, históricos, lembrados, marcantes...

É com imensa gratidão que lhe agradeço por ser não apenas meu orientador no tão almejado curso de mestrado em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, mas sim pelos ensinamentos consagrados durante esse curto período de convivência. Ensinamentos esses, concebidos através de suas imensuráveis qualidades de intelectualidade, simplicidade, generosidade, sensatez, honestidade, eloquência e benevolência; que tornaram-me uma pessoa mais madura e compreensível, dessa forma se internaram e eternizaram-se em mim., fazendo-me entender o que parecia ser obscuro, complexo e intrigado. Efetivamente agradeço por ser meu orientador pelo resto da vida.

Admiro muito você...

Aos Meus Eternos Mestres,

Idelmo Rangel Garcia-Júnior, Francisley Ávila de Souza, Osvaldo Magro Filho, Daniela Ponzoni, Alessandra Marcondes Aranega e Ana Paula Bassi. Agradeço-lhes por de alguma forma contribuírem com a construção dos meus conhecimentos adquiridos durante minha formação de mestre e por assim dizer, me oferecem subsídios moral, social, literário e científico para a minha vida profissional.

Enfim, muito obrigada por tudo...

Aos Meus Eternos Mestres e Atuais Colegas de Trabalho

Nikeila Chacon de Oliveira Conde e Giorge Pessoa de Jesus, agradeço pela oportunidade de terem sido meus professores durante minha graduação no curso de odontologia da Universidade Federal do Amazonas – FAO/UFAM e assim sendo, pelos seus ensinamentos oferecidos. A vocês sou imensamente grata pela confiança em mim depositada e pela oportunidade de hoje trabalharmos juntos.

Obrigada pela fonte de inspiração profissional e pessoal...

Aos Meus Grandes Amigos,

Rafaela Brasil Nunes, Paula Marinho, Rogério Fernando Bencini, Dênisson Pontes, Diogo Henrique Ohse, Carlos Bueno e Adriano Brust (in memoriam), agradeço a vocês por serem meus melhores amigos e, durante minha vida compartilharam dos meus caminhos e desvios; alegrias e tristezas; prantos e risos; ganhos e perdas. Em especial ao meu eterno amigo Adriano Brust (Brustinho), apesar da separação abrupta e precoce, agradeço a Deus pela sua verdadeira amizade durante esse período de convivência.

Adoro muito vocês...



Agradecimentos

Agradecimentos

Ao programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita filho” - FOA/UNESP e à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas – FAO/UFAM.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”- FOA/UNESP.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação e biblioteca da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” - FOA/UNESP.

Aos funcionários e pacientes do Hospital Santa Casa e Unimed de Araçatuba e Birigui.

Aos colegas do Curso de pós-graduação, pela convivência e ensinamentos.

A todos vocês só tenho a agradecer...



Epígrafe

*“A sabedoria superior
tolera, a inferior julga; a superior alivia, a
inferior culpa; a superior perdoa, a inferior
condena. Tem coisas que o coração só fala
para quem sabe escutar.”*

*“O Cristo não pediu muita coisa, não exigiu
que as pessoas escalassem o Everest ou
fizessem grandes sacrifícios. Ele só pediu que
nos amássemos uns aos outros.”*

Chico Xavier

Resumo

Corrêa APS. Análise histomorfométrica do processo de reparo após o reimplante de dentes de rato mantidos em soro do leite bovino e leite integral [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2014.

O período mínimo de permanência extra-alveolar em meio seco ou o uso de um adequado meio de estocagem são determinantes para a manutenção da vitalidade do ligamento periodontal (LP). O soro do leite apresenta propriedades similares as do leite, tal condição despertou a atenção para investigar a sua utilização como meio de estocagem. O objetivo deste estudo foi avaliar o processo de reparo após o reimplante de dentes de rato previamente mantidos no soro do leite e leite integral. Foram empregados incisivos superiores direitos de 36 ratos divididos em 4 grupos de 9 animais. No grupo I os dentes foram extraídos e reimplantados imediatamente (controle positivo). No grupo II os dentes foram imersos em 50mL de soro do leite bovino doce, por 60 minutos. No grupo III os dentes foram mantidos, por 60 minutos, em 50mL de leite bovino longa vida integral, Leite UHT (Parmalat®). No grupo IV os dentes foram mantidos em meio seco pelo mesmo período (controle negativo). Em seguida, os dentes dos animais dos Grupos II, III e IV foram reimplantados em seus alvéolos. Os animais foram submetidos à eutanásia 60 dias após o reimplante. Os espécimes foram corados pela Hematoxilina e eosina para avaliação histomorfométrica. Em relação a organização do LP e a extensão e profundidade da reabsorção inflamatória, houve diferença estatisticamente

significante entre os grupos I (Imediato) e IV (Tardio) ($p < 0,05$). O soro do leite e o leite UHT apresentaram resultados semelhantes, sendo assim o soro do leite pode ser indicado como meio de estocagem para dentes avulsionados.

Palavras-Chave: Avulsão dentária; Reimplante dentário; Leite.

Abstract

Corrêa APS. Histomorphometric analysis of the healing process after replantation of rat teeth maintained in bovine milk whey and whole milk [dissertation]. Araçatuba: UNESP – São Paulo State University; 2014.

Minimal extra-alveolar dry storage period or uses of a suitable storage media are crucial to maintaining the vitality of the periodontal ligament (PDL). Whey has similar properties to milk, such a condition attracted attention for investigating its use as a storage medium. The aim of this study was to evaluate the repair process after replantation of rat teeth previously kept in whey and whole milk. To this, 36 male rats were used, under general anesthesia upper right incisor were extracted and reimplanted. Treatment was performed, dividing in four groups, of 9 animals each. Group I without any treatment the teeth were immediately reimplanted (positive control). Group II teeth were immersed in 50mL sweet whey, for 60 minutes. Group III teeth were kept for 60 minutes in 50mL long shelf-life whole milk, UHT (Parmalat ®). Group IV teeth were kept in dry for the same period (negative control). Then, animals tooth in Groups II, III and IV were reimplanted in their sockets. The animals were subjected euthanasia 60 days after replantation. The specimens were stained in Hematoxylin and eosin for histomorphometric analysis. Regarding the organization of the periodontal ligament and the extent and depth of inflammatory resorption, there was a statistically significant difference between

groups I (Immediate) and IV (Late). The whey milk and whole milk showed similar results and therefore the whey can be indicated as the storage medium for avulsed teeth.

Keywords: Tooth avulsion; Tooth replantation; Milk.

Lista de figuras

Figura 1 -	GI (reimplante imediato). Tecido ósseo (TO) normal, organização do ligamento periodontal (LP), integridade da camada de cimento (C) e dentina (D) e tecido pulpar em degeneração (P). H. E. Aumento original 200x.	40
Figura 2-	GI (reimplante imediato). Organização do ligamento periodontal (LP), integridade da camada de cimento (C) e dentina (D) e do tecido ósseo (TO). H. E. Aumento original 400x.	40
Figura 3 -	GI (reimplante imediato). Reabsorção inflamatória encontrada apenas na região cervical. H. E. Aumento original 400x.	40
Figura 4-	GI (reimplante imediato). Características do tecido conjuntivo pulpar (P) com ausência da camada de odontoblastos. H. E. Aumento original 400x.	40
Figura 5 -	GII (soro do leite). Tecido ósseo (TO) normal, organização do ligamento periodontal (LP), integridade da camada de cimento (C) e dentina (D) e características do tecido pulpar (P). H. E. Aumento original 200x.	42
Figura 6 -	GII (soro do leite). Organização do ligamento periodontal (LP), integridade da camada de cimento (C) e dentina (D) e do tecido ósseo (TO). H. E. Aumento original 400x.	42
Figura 7 -	GII (soro do leite). Áreas de reabsorção por substituição (setas negras) foram encontradas em algumas porções da raiz. H. E. Aumento original 400x.	42
Figura 8-	GII (soro do leite). Características do tecido conjuntivo pulpar (P) com ausência da camada de odontoblastos. H. E. Aumento original 400x.	42
Figura 9 -	GIII (leite UHT). Figura 9 – GIII (leite). Tecido ósseo (TO) normal, organização do ligamento periodontal (LP), integridade do cimento (C) e dentina (D) e	44

tecido pulpar com ausência da camada de odontoblastos (P). H. E. Aumento original 200x.

Figura 10 -	GIII (leite UHT). Organização do ligamento periodontal (LP), integridade do cimento (C) e dentina (D) e do tecido ósseo (TO). H. E. Aumento original 400x.	44
Figura 11 -	GIII (leite UHT). Áreas de reabsorção por substituição (setas negras) foram encontradas em algumas porções da raiz. H. E. Aumento original 400x.	44
Figura 12 -	GIII (leite UHT). Características do tecido conjuntivo pulpar (P) com ausência da camada de odontoblastos, porém apresentando organização do tecido conjuntivo. H. E. Aumento original 400x.	44
Figura 13 -	GIV (reimplante tardio). Tecido ósseo (TO) normal, organização do ligamento periodontal (LP), integridade da dentina (D), ausência do cimento e tecido pulpar necrosado (P). H. E. Aumento original 200x.	46
Figura 14 -	GIV (reimplante tardio). Pode-se observar ausência de organização do ligamento periodontal (LP), com grande quantidade de células inflamatórias. Poucas áreas com integridade da dentina (D) e do tecido ósseo (TO) e ausência do cimento. H. E. Aumento original 400x.	46
Figura 15 -	GIV (reimplante tardio). Áreas de reabsorção inflamatória (setas brancas) foram encontradas em várias porções da raiz. H. E. Aumento original 400x.	46
Figura 16 -	GIV (reimplante tardio). Tecido pulpar (P) necrosado. H. E. Aumento original 400x.	46
Figura 17 -	Incisivos superiores.	77
Figura 18 -	Sindesmotomia e luxação.	77
Figura 19 -	Extração dentária.	77
Figura 20 -	Dente extraído.	77
Figura 21 -	Dente extraído e mantido no soro do leite.	77
Figura 22 -	Reimplante.	77

Lista de Tabelas

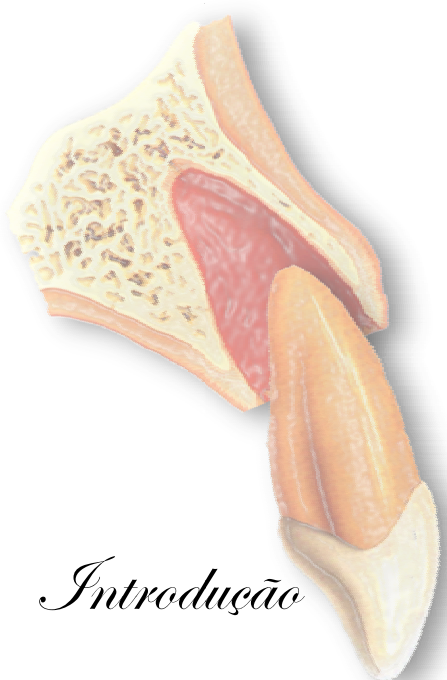
Tabela 1-	Valor de (p) obtido após o teste Kruskal-Wallis comparando os quatro grupos.	78
Tabela 2-	Apresenta os valores numéricos dos eventos histomorfológicos e dos escores obtidos nos quatro grupos experimentais.	79

Lista de Abreviaturas

LP =	Ligamento periodontal
HBSS =	Solução salina balanceada de Hank
µm =	Micrometros
H.E =	Hematoxilina e eosina
IGF =	Fator de crescimento semelhante à insulina
FGF =	Fator de crescimento para fibroblastos
TGF =	Fator de crescimento tecidual
PDGF =	Fator de crescimento derivado das plaquetas
αMEM =	Alfa-amino-essencial

Sumário

1. Introdução	22
2. Proposição	27
3. Material e Método	29
4. Resultado	38
5. Discussão	47
6. Conclusão	56
<i>Referências</i>	58
<i>Anexo</i>	67



Introdução

1 Introdução

A avulsão dentária caracteriza-se pelo rompimento do feixe vâsculo-nervoso e das fibras do ligamento periodontal, resultando no completo deslocamento do dente do seu respectivo alvéolo. Apesar de pouco frequente, a prática de esportes, trabalhos de alto risco e o uso cada vez maior de veículos automotores têm contribuído para a sua ocorrência.¹

A avulsão de dentes permanentes é dentre as lesões traumáticas dento-alveolares a mais complexa e, seu prognóstico depende quase que exclusivamente do período de permanência do dente fora do seu alvéolo. Portanto, o reimplante imediato é o tratamento de escolha.^{1,2} O sucesso no tratamento de dentes reimplantados depende não apenas do tempo de permanência extra-oral, mas sim da manutenção da vitalidade das células do ligamento periodontal (LP). A necrose dos remanescentes do LP resulta no desenvolvimento da reabsorção radicular e na subsequente perda do elemento.¹⁻⁴

Embora o reimplante imediatamente após o trauma seja a melhor opção de tratamento, nem sempre é possível a sua realização, devido a associação com lesões extensas com risco de vida, dano complexo ao alvéolo e a falta de conhecimento do procedimento de reimplante.⁴ Estudos clínicos demonstram melhor prognóstico quando o período extra-alveolar não excede 5 minutos.^{4,5} Desta forma, dentes avulsionados que permanecem por um longo período de

tempo no meio seco ou em inadequado meio de estocagem apresentam menores taxas de sucesso.⁶ Sendo assim, como o reimplante imediato raramente ocorre, incessantes pesquisas em busca de um meio de estocagem que mantenha a vitalidade do ligamento periodontal vem sendo realizadas.

O meio de conservação ideal deve estar disponível no momento da avulsão ou ser de fácil obtenção, deve apresentar a propriedade de manter a capacidade mitogênica e clonagênica do LP,^{7,8} apresentar pH e osmolaridade fisiologicamente compatíveis; não deve provocar danos às células do LP e reação antígeno-anticorpo. Ser eficaz em diferentes condições e possuir a capacidade de aumentar o potencial osteoclastogênico, além de apresentar propriedade antimicrobiana.^{9,10}

O uso de um adequado meio de estocagem é determinante para a manutenção do LP, sendo assim diferentes meios de conservação têm sido utilizados; desde meios tradicionais, incluindo água da torneira,¹¹ saliva,¹² soro fisiológico⁶ e leite,^{13,14} inclusive meios de cultura, tais como o de Eagle (α MEM),⁸ solução salina balanceada de Hank (HBSS)^{7,11,15} e ViaSpan.^{® 8,16} Outras formas de estocagem tem sido avaliadas como, água de coco,^{3,17} Euro-Collins,¹⁸ Ricetral,¹⁹ chá verde,²⁰ leite de soja,²¹ leite em pó,²² própolis,²³ Gatorade^{® 24} e solução para lentes de contato.²⁵ Nos últimos anos a adição de fatores de crescimento (IGF, FGF, TGF e PDGF) em meios de cultura e a utilização de agentes antioxidantes para manutenção da viabilidade das células do LP, tem sido alvos de estudo.²⁶⁻²⁹

O leite apresenta várias características favoráveis, uma vez que é uma solução isotônica, com pH neutro e osmolaridade fisiológicos, apresenta baixo teor de contaminação, além de conter fatores de crescimento e nutrientes

essenciais.³⁰ Por assim prevenir a morte das células do LP, em adição ao seu baixo custo e fácil acesso no momento do trauma, o leite ainda tem sido amplamente recomendado como meio de estocagem, apesar de outras soluções apresentarem resultados superiores aos seus.^{8,13,14,18,22,31}

Recentemente, o soro do leite bovino tem despertado o interesse de diversos pesquisadores, por apresentar alto teor de aminoácidos essenciais e cálcio, além de diversos peptídeos bioativos que lhe conferem excelentes propriedades biológicas. É um subproduto da fração aquosa do leite, obtido durante o processo de fabricação do queijo. No decorrer de décadas essa parte do leite não apresentava utilidade, sendo assim era considerado como resíduo e por fim dispensado pelas indústrias.^{32,33}

O soro do leite doce é obtido pelo processo de coagulação enzimática de queijos como, cheddar, mussarela, coalho e suíço. Os valores do seu pH variam de 6,0 a 7,0. O soro do leite ácido é originado pela manufatura da caseína, por meio do emprego do ácido láctico ou clorídrico durante a fabricação do queijo cottage ou ricota. Os valores do pH desse tipo de soro varia de 3,8 a 4,6. No que se refere às aplicações, a partir do soro são obtidos concentrados ou isolados de suas proteínas, por meio da separação física por membranas. Dessa forma, obtem-se produtos com perfis específicos qualitativos e quantitativos de proteínas, permitindo que seus componentes apresentem diversas aplicabilidades, como por exemplo na forma de suplementos alimentares.³²⁻³⁴

Achados científicos tem demonstrado que as proteínas do soro do leite apresentam potente ação antioxidante, antiinflamatória, antimicrobiana e reguladoras da síntese proteica e da função imunológica. Estão associadas a

inúmeros benefícios à saúde, notadamente ao que se refere aos problemas cardiovasculares, cancerígenos, obesidade e osteoporose. O soro do leite também apresenta benefícios para o desempenho muscular e possui propriedade antiviral e antiulcerogênica.³²⁻³⁵

O soro do leite, além de rica fonte proteica, contém vários fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento semelhantes à insulina (IGF-1 e IGF-2), fator de crescimento para fibroblastos (FGF- α e FGF- β), fator de crescimento tecidual (TGF-1 e TGF-2) e fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF).³⁶ Estudos tem demonstrado seus benefícios no processo de reparo tecidual, ao estimular a proliferação celular (mitogênese) de células epiteliais e fibroblástica. A atividade mitogênica é atribuída ao efeito sinérgico dos fatores de crescimento sobre os tecidos.³⁷

Recentes pesquisas sobre o efeito das proteínas do soro do leite na proliferação e diferenciação de células osteoblásticas, demonstrou aumento nos níveis de cálcio e osteocalcina, portanto apresentam efeito direto sobre a formação e reabsorção óssea.^{38,39}

Em virtude das suas propriedades, que de certa forma assemelham-se com as características ditas como necessárias para um adequado meio de estocagem e, como não foram encontrados trabalhos na literatura que avaliam a eficácia do soro do leite como meio de conservação de dentes avulsionados, é oportuno a realização deste estudo.



Proposição

2 Proposição

O propósito deste trabalho foi avaliar, por meio da análise histomorfométrica, o processo de reparo dento-alveolar após o reimplante de dentes de rato mantidos previamente no soro do leite bovino e leite longa vida integral.

Material e Método



3 Material e Método

Previamente à sua realização, este projeto experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – CEUA/UNESP (Anexo A). Foram utilizados 36 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, com peso corporal variando entre 250 a 300 gramas, divididos em 4 grupos com 9 animais cada. Os animais foram obtidos e mantidos junto ao biotério da Faculdade de odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

O procedimento cirúrgico nos animais iniciou-se com a indução da anestesia geral. Para tal, foi administrado por via intramuscular, Cloridrato de Xilazina (*Anasedan AgribRANDS Ltda.*) na dosagem de 0,03ml para cada 100g de peso corporal, para promover um relaxamento muscular. Na sequência foi utilizado o Cloridrato de Ketamina (*Dopalen AgribRANDS Ltda.*) na dosagem de 0,07ml para 100g de peso corporal para obtenção do efeito sedativo. Posteriormente, foi realizada a antissepsia da porção anterior da maxila, com polivinilpirrolidona-iodo (Riodeine® – Ind. Farmac. Rioquímica Ltda.), sindesmotomia, luxação e extração do incisivo superior direito com auxílio de instrumental especialmente adaptado.

Após a extração dos dentes, quatro grupos foram assim constituídos:

Grupo I: os dentes foram mantidos em gaze embebida com soro fisiológico 0,9% durante o período de 5 minutos e foram imediatamente reimplantados em seus respectivos alvéolos (controle positivo).

Grupo II: os dentes foram imersos em 50mL de soro do leite doce (Balkis Indústria e Comércio de Laticínios Ltda., Santo Antônio do Aracangua, São Paulo/Brasil).

Grupo III: os dentes foram imersos em 50mL de leite longa vida integral, Leite UHT (Parmalat®).

Grupo IV: os dentes foram mantidos em meio seco, sobre a bancada, presos pela coroa em uma lâmina de cera utilidade, pelo mesmo período (controle negativo).

Com exceção dos dentes do Grupo I, todos os demais foram mantidos em seus respectivos meios acondicionados em recipientes plásticos, individuais e não esterilizados, pelo período de 60 minutos em temperatura de 25°C.

Em seguida, os dentes extraídos dos grupos II, III e IV foram reimplantados em seus respectivos alvéolos preparados por meio de limpeza cirúrgica com auxílio de uma cureta e irrigação com soro fisiológico. Não foi realizada contenção e os animais foram alimentados durante o período do experimento com ração sólida triturada e água a vontade (*ad libitum*).

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 e prednisona 0,05 mg/kg (Fontoura Wyeth S.A. – São Paulo – Brasil) por via subcutânea.

Decorridos 60 dias do ato operatório, os animais foram submetidos à eutanásia por dose excessiva do anestésico. A maxila direita, contendo o dente

reimplantado, foi separada na linha mediana com o emprego de uma lâmina de bisturi nº 15 (EMBRAMAC Exp. e Imp. – São Paulo – Brasil). Um corte com a tesoura reta ao nível da porção distal do 3º molar possibilitou a obtenção da maxila direita contendo o dente reimplantado.

Os espécimes assim obtidos foram fixados em solução de formalina a 10% por 24 horas e descalcificados em solução de EDTA a 10%, pH 7,0.

Após a descalcificação, as peças foram processadas e incluídas em parafina. Os blocos receberam cortes semi-seriados com 6µm de espessura, no sentido longitudinal, e foram corados pela hematoxilina e eosina para análise histológica e morfométrica.

A análise microscópica foi realizada com o auxílio de microscópio óptico (Axiolab – Zeiss, Alemanha), e somente a face palatina da raiz foi considerada, já que o dente de rato só apresenta ligamento periodontal nesta face. Foram analisadas as características do ligamento periodontal, osso alveolar, cimento e dentina.

Para a quantificação das ocorrências histomorfológicas foram atribuídos escores de 1 a 4 aos 17 diferentes eventos abaixo listados, em que 1 correspondeu ao melhor resultado e 4 ao pior, ocupando os escores 2 e 3 posições intermediárias.

Eventos considerados para a análise dos resultados:

1) Local da inserção epitelial:

- 1 - Junção cimento-esmalte;
- 2 - Abaixo da junção cimento-esmalte;
- 3 - Muito abaixo da junção cimento-esmalte (perto do terço médio);

4 - Ausência do epitélio juncional.

2) Processo inflamatório agudo e crônico próximo do local da inserção epitelial.

2.1) Intensidade do processo inflamatório baseado no critério descrito por Wolfson and Seltzer:⁴³

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.

2.2) Extensão do processo inflamatório:

1- Ausência ou presença ocasional de células inflamatórias;

2 - Processo inflamatório restrito à lâmina própria da parte interna do epitélio;

3- Processo inflamatório estendendo apicalmente até a pequena porção do tecido conjuntivo subjacente à lâmina própria da porção interna do epitélio gengival;

4 - Processo inflamatório atingindo proximidade da crista óssea alveolar.

3) Ligamento Periodontal

3.1) Organização do ligamento periodontal:

1 - Fibras periodontais inseridas no osso e cimento 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 – Mesmo critério empregado próximo à área da inserção epitelial.

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.

4) Raiz do dente

4.1) 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.

4.2) Extensão da reabsorção radicular. Em lâminas representativas foram feitas medidas (em micrometros) da extensão das áreas de reabsorção. A medida dos valores obtidos por palatina permitiu a atribuição dos seguintes escores:

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

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

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

4.4) Reparo nas áreas de reabsorção radicular:

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

5) Tecido ósseo

5.1) Áreas de reabsorção ativa e inativa:

- 1 - Ausência de área de reabsorção;
- 2 - Presença de área de reabsorção inativa (ausência de células clásticas);
- 3 - Presença de pequenas áreas de reabsorção ativa;
- 4 - Presença de extensas áreas de reabsorção ativa.

6) 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.

7) Polpa

- 1- Normal;
- 2- Presença de calcificações;
- 3- Degenerada;
- 4- Necrosada.

Em seguida as imagens foram capturadas utilizando uma câmera digital (Leica DFC soofx, Leica microsystems, Heerbrug, Switzerland), acoplada ao microscópio *Carl Zeiss* (Axiolab) e conectada a um computador Pentium III com um *software* analisador de imagens digitalizadas (Leica Câmera Software Box, Leica Imaging Manager – IM 50 Demo software).

Os valores dos escores foram submetidos à análise estatística qualitativa, 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 para selecionar o teste mais adequado.

O teste de Kruskal-Wallis, para comparações múltiplas de dados não-paramétricos foi utilizado para confrontação das amostras com nível de significância de 5%. Quando evidenciada diferença estatística significativa, o teste de Dunn foi utilizado para comparações individuais entre os grupos.



Resultado

4 Resultado

Grupo (Reimplante imediato)

A reinserção epitelial ocorreu na junção cimento-esmalte (9/9). No tecido conjuntivo subjacente o processo inflamatório caracterizou-se pela presença de moderado número de células inflamatórias e, se restringia à lâmina própria da parte interna do epitélio em todos os espécimes (9/9). O espaço do ligamento periodontal apresentou-se organizado com suas fibras inseridas no osso e cimento em toda extensão do ligamento (6/9) e em dois terços (3/9). Observou-se pequeno número de células inflamatórias em toda extensão do ligamento periodontal. O cimento e a dentina apresentaram-se íntegros na maior parte da superfície radicular (Figuras 1 e 2) com pequenas áreas de reabsorções ativas que atingiam pequena profundidade e extensão (7/9). Apenas na região cervical, na área de apreensão do instrumento utilizado para a extração dentária, foi encontrada reabsorção inflamatória (5/9) (Figura 3). A polpa dentária apresentou-se de aspecto normal (2/9), em processo de degeneração (5/9) ou necrosada (2/9) (Figura 4).

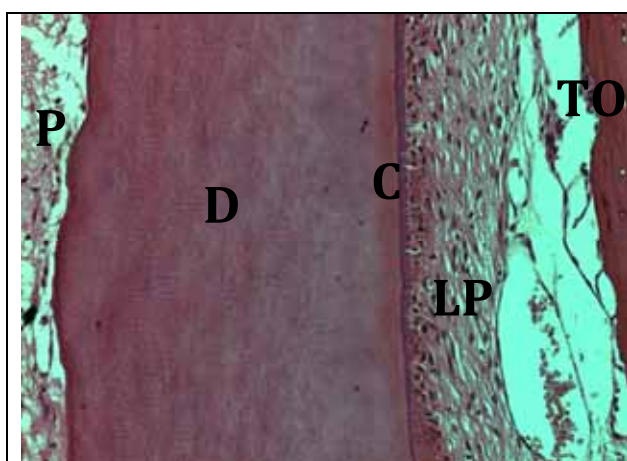


Figura 1 – GI (reimplante imediato). Tecido ósseo (TO) normal, organização do ligamento periodontal (LP), integridade da camada de cimento (C) e dentina (D) e tecido pulpar em degeneração (P). H. E. Aumento original 200x.

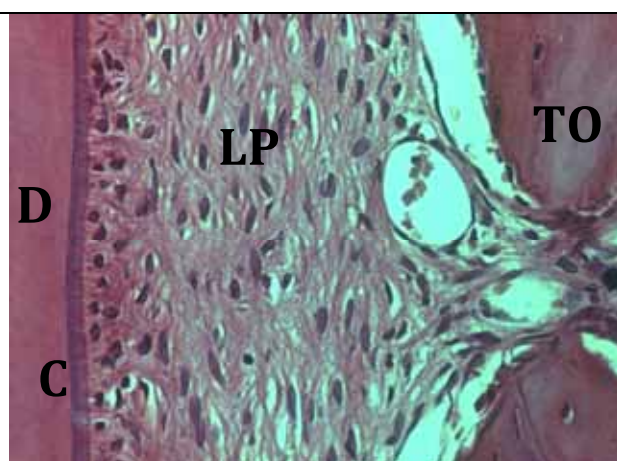


Figura 2 – GI (reimplante imediato). Organização do ligamento periodontal (LP), integridade da camada de cimento (C) e dentina (D) e do tecido ósseo (TO). H. E. Aumento original 400x.

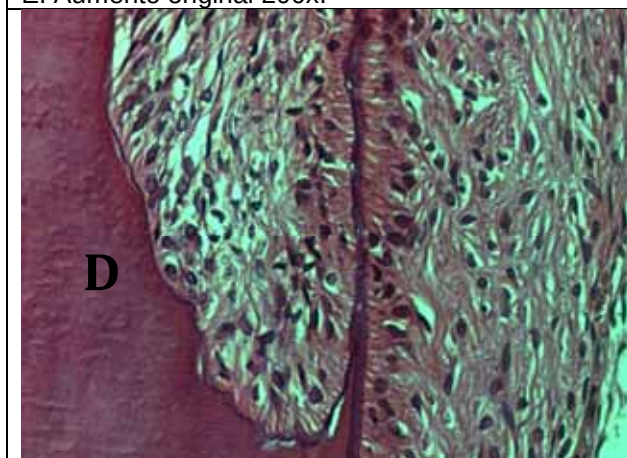


Figura 3 – GI (reimplante imediato). Reabsorção inflamatória encontrada apenas na região cervical. H. E. Aumento original 400x.

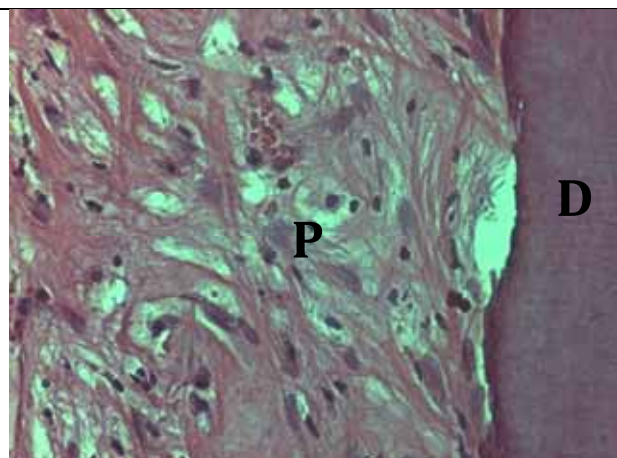


Figura 4 – GI (reimplante imediato). Características do tecido conjuntivo pulpar (P) com ausência da camada de odontoblastos. H. E. Aumento original 400x.

Grupo II (Soro do leite)

A reinserção epitelial ocorreu na junção cimento-esmalte (9/9). O tecido conjuntivo subjacente apresentou um infiltrado inflamatório com presença de pequeno número de células inflamatórias agudas (6/9) e moderado número de células inflamatórias crônicas (6/9), que se estendiam para a crista óssea alveolar. O espaço do ligamento periodontal apresentou-se bem organizado com suas fibras inseridas no osso e cimento, em toda extensão do ligamento (3/9), em dois terços (2/9) e um terço da extensão do ligamento periodontal (3/9) (Figuras 5 e 6). O ligamento periodontal apresentou-se com pequeno número de células inflamatórias em toda a sua extensão (7/9). Na região cervical, na área de apreensão do instrumento utilizado para a extração dentária, foi encontrada reabsorção inflamatória. O cimento e a dentina apresentaram-se íntegros na maior parte da superfície radicular com pequenas áreas de reabsorções ativas que atingiam profundidade e extensão média (4/9). Foram encontrados espécimes com ausência de reabsorção por substituição (3/9), com presença de pequenos pontos de anquilose (3/9) e poucos espécimes com um terço da raiz anquilosada (2/9) (Figuras 7). A polpa dentária apresentou-se em processo de degeneração (9/9) (Figura 8).

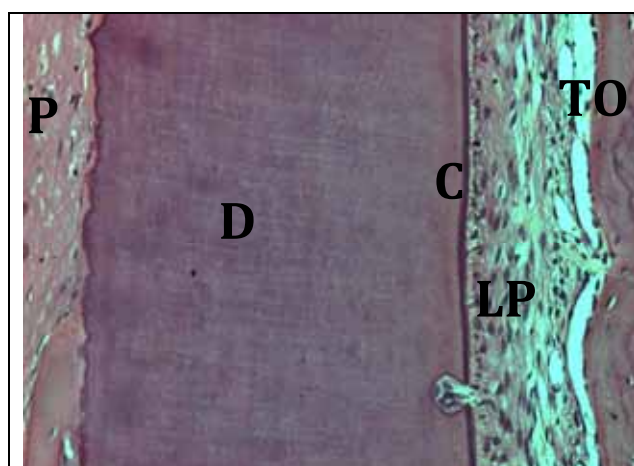


Figura 5 – GII (soro do leite). Tecido ósseo (TO) normal, organização do ligamento periodontal (LP), integridade da camada de cimento (C) e dentina (D) e características do tecido pulpar (P). H. E. Aumento original 200x.

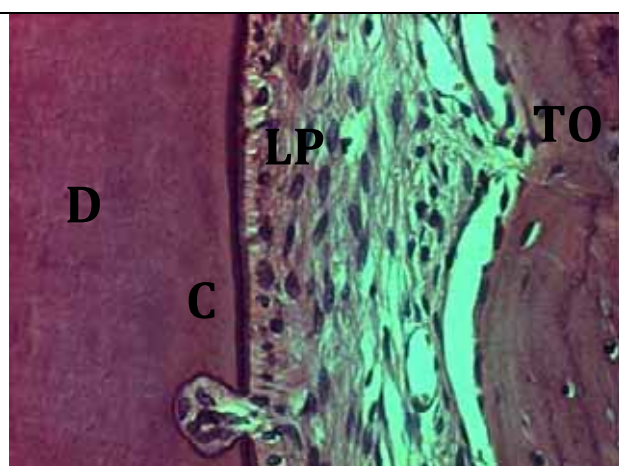


Figura 6 – GII (soro do leite). Organização do ligamento periodontal (LP), integridade da camada de cimento (C) e dentina (D) e do tecido ósseo (TO). H. E. Aumento original 400x.

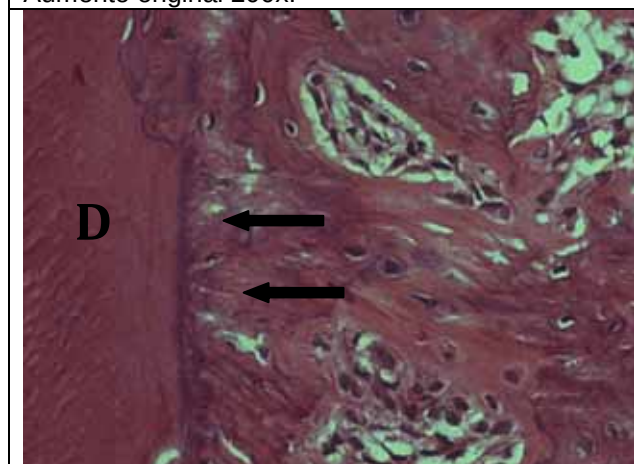


Figura 7 – GII (soro do leite). Áreas de reabsorção por substituição (setas negras) foram encontradas em algumas porções da raiz. H. E. Aumento original 400x.

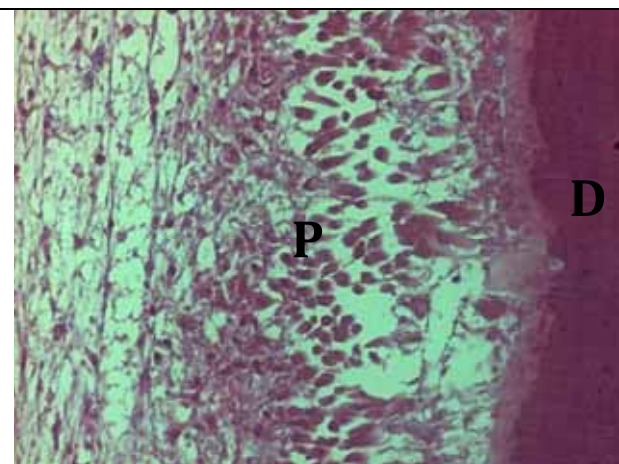


Figura 8 – GII (soro do leite). Características do tecido conjuntivo pulpar (P) com ausência da camada de odontoblastos. H. E. Aumento original 400x.

Grupo III (Leite UHT)

A reinserção epitelial ocorreu na junção cimento-esmalte (9/9). No tecido conjuntivo subjacente observou-se um infiltrado inflamatório com presença de moderado número de células inflamatórias, que se restringia à lâmina própria da parte interna do epitélio na maior parte dos espécimes (9/9). O espaço do ligamento periodontal apresentou-se bem organizado com suas fibras inseridas no osso e cimento em metade da extensão do ligamento (9/9) (Figuras 9 e 10). O ligamento periodontal apresentou-se com pequeno número de células inflamatórias em toda a sua extensão (7/9). Na região cervical, na área de apreensão do instrumento utilizado para a extração dentária, foi encontrada reabsorção inflamatória. O cimento e a dentina apresentaram-se íntegros com ausência de anquilose (4/9) ou pequenas áreas de reabsorção por substituição (5/9) (Figuras 10 e 11). Foi observado em algumas espécime a polpa dentária com aspecto normal (2/9) ou em processo de degeneração (2/9). Em grande parte dos espécimes a polpa apresentou-se necrosada (5/9) (Figura 12).



Figura 9 – GIII (leite). Tecido ósseo (TO) normal, organização do ligamento periodontal (LP), integridade do cimento (C) e dentina (D) e tecido pulpar com ausência da camada de odontoblastos (P). H. E. Aumento original 200x.

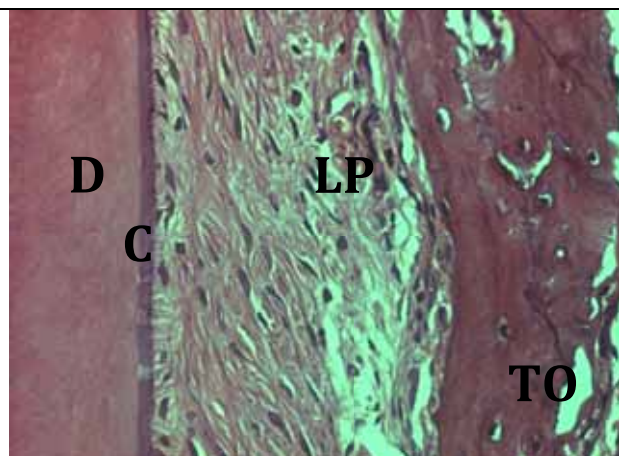


Figura 10 – GIII (leite). Organização do ligamento periodontal (LP), integridade do cimento (C) e dentina (D) e do tecido ósseo (TO). H. E. Aumento original 400x.

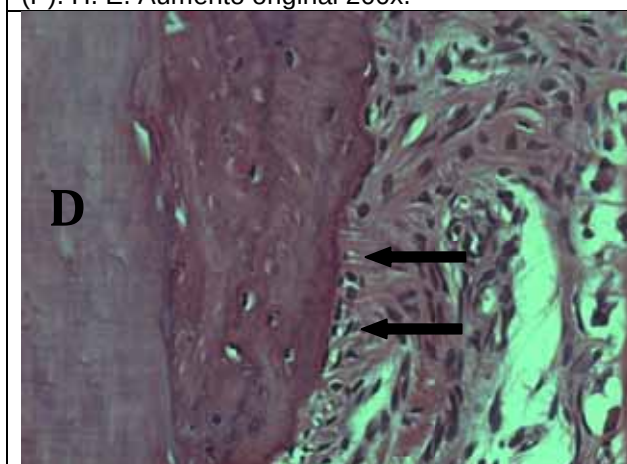


Figura 11 – GIII (leite). Áreas de reabsorção por substituição (setas negras) foram encontradas em algumas porções da raiz. H. E. Aumento original 400x.

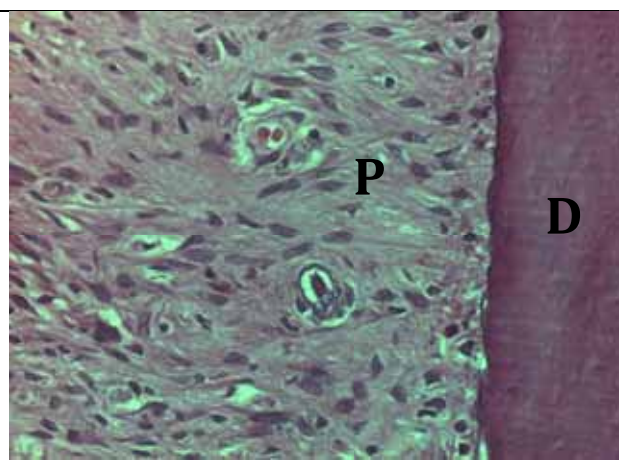


Figura 12 – GIII (leite). Características do tecido conjuntivo pulpar (P) com ausência da camada de odontoblastos, porém apresentando organização do tecido conjuntivo. H. E. Aumento original 400x.

Grupo IV (Reimplante tardio)

A reinserção epitelial ocorreu na junção cimento-esmalte (9/9). No tecido conjuntivo subjacente observou-se um infiltrado inflamatório com presença de grande número de células inflamatórias, que não se restringia à lâmina própria da parte interna do epitélio na maior parte dos espécimes (8/9). O ligamento periodontal apresentou-se com intenso número de células inflamatórias em toda a sua extensão (6/9) (Figura 13). O espaço do ligamento periodontal apresentou-se pobremente organizado com suas fibras inseridas no osso e cimento, em poucas porções da extensão do ligamento (9/9) (Figura 14). Na região cervical, na área de apreensão do instrumento utilizado para a extração dentária, foi encontrada reabsorção inflamatória. O cimento e a dentina apresentaram-se íntegros em raras áreas da superfície radicular. Áreas de reabsorção inflamatória foram encontradas em quase toda a extensão da raiz (9/9) (Figura 15). Evidenciou-se necrose da polpa em todos os espécimes analisados (9/9) (Figura 16).

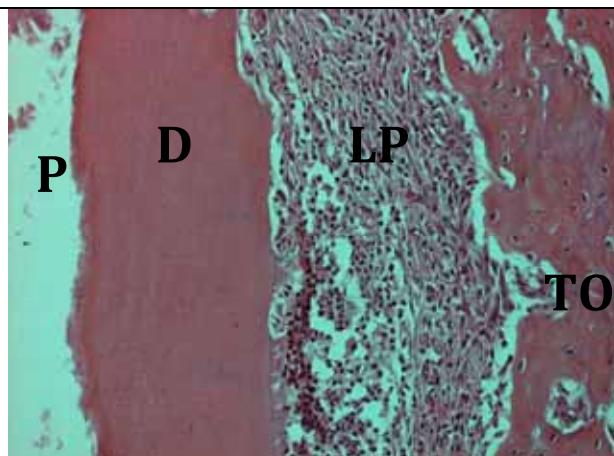


Figura 13 – GIV (reimplante tardio). Tecido ósseo (TO) normal, organização do ligamento periodontal (LP), integridade da dentina (D), ausência do cimento e tecido pulpar necrosado (P). H. E. Aumento original 200x.

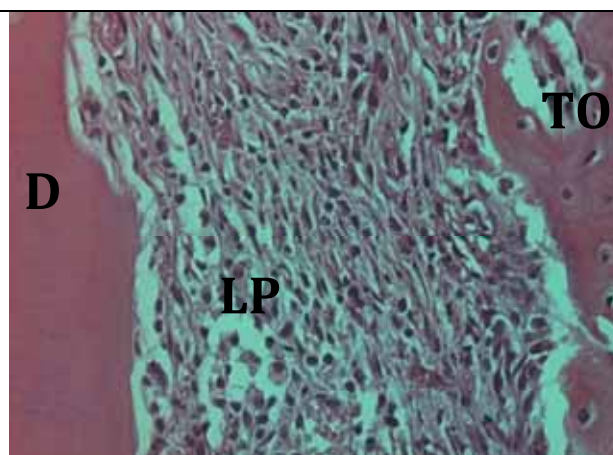


Figura 14 – GIV (reimplante tardio). Pode-se observar ausência de organização do ligamento periodontal (LP), com grande quantidade de células inflamatórias. Poucas áreas com integridade da dentina (D) e do tecido ósseo (TO) e ausência do cimento. H. E. Aumento original 400x.

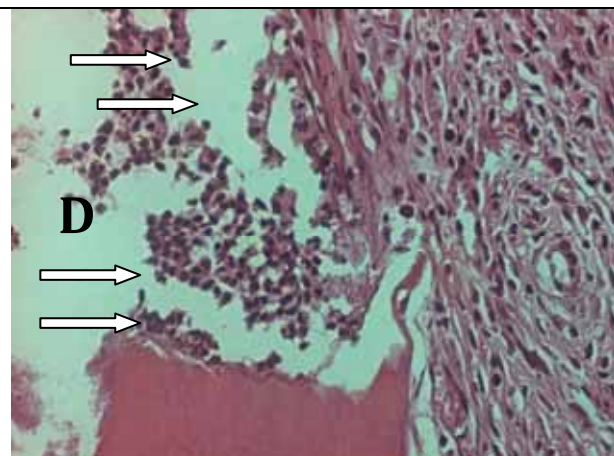


Figura 15 – GIV (reimplante tardio). Áreas de reabsorção inflamatória (setas brancas) foram encontradas em várias porções da raiz. H. E. Aumento original 400x.

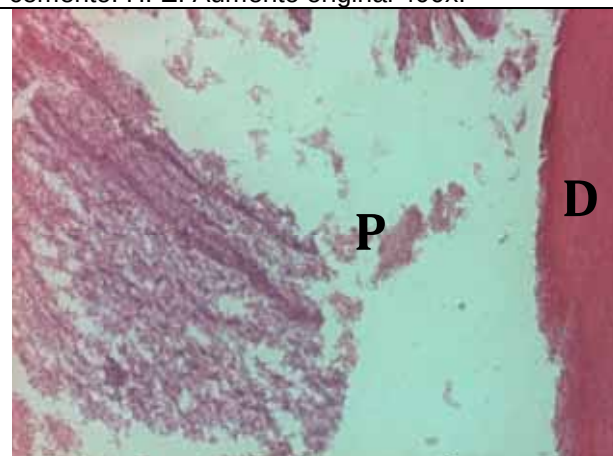


Figura 16 – GIV (reimplante tardio). Tecido pulpar (P) necrosado. H. E. Aumento original 400x.



Discussão

5 Discussão

O maior desafio frente ao reimplante de dentes avulsionados é evitar a perda definitiva do mesmo. Existem poucos estudos que avaliam a longo prazo o sucesso do tratamento de dentes avulsionados e, relatam cerca de 30% de perdas dentárias após o reimplante.^{4,41}

O tratamento ideal para um dente que sofreu avulsão é o seu reimplante imediato, o que significativamente melhora o prognóstico.^{1,2,22,42} O período extra-alveolar no meio seco ou em solução de estocagem influenciam na manutenção da vitalidade dos remanescentes do ligamento periodontal (LP) e consequentemente, na ocorrência da reabsorção radicular externa inflamatória ou por substituição (anquilose), as quais são responsáveis pela perda do dente.^{4,41}

Taxas de reabsorção radicular inflamatória de cerca de 24% a 30% e 61% de reabsorção por substituição após o reimplante, são descritas na literatura.^{4,41} Ausência de reabsorção foi visualizada em dentes reimplantados imediatamente ou no período de 10 minutos. Em contraste todos os dentes reimplantados 15 minutos após a avulsão mostraram algum grau de reabsorção radicular.² Melhores prognósticos são observados quando o período extra-alveolar não excede 5 minutos.^{4,5} Em trabalho experimental observou-se a presença de intensa reabsorção inflamatória após 30 minutos em meio seco e

90 minutos em solução salina de soro fisiológico e saliva. Intensa reabsorção por substituição ocorreu após 60 minutos em meio seco e 120 minutos em solução fisiológica e saliva.⁶

Dentre os diversos meios de estocagem até então estudados, o leite bovino, em virtude de suas propriedades, vem demonstrando bons resultados. Estudos anteriores constataam a efetividade da manutenção da viabilidade das células do LP até 6 horas.⁴³ As características favoráveis do leite aliado a sua fácil disponibilidade no local do acidente, permitem que seja amplamente indicado como meio de conservação e transporte para dentes avulsionados.²²

A singularidade do leite em promover a manutenção da vitalidade das células do LP ocorre devido a presença de nutrientes essenciais, como aminoácidos, carboidratos e vitaminas, além dos fatores de crescimento.^{13,30} Entre as diferentes formas de apresentação do leite bovino, recentes estudos *in vitro* tem demonstrado que não há diferença na manutenção da viabilidade das células do LP entre o leite em pó e leite integral longa vida após 1 hora de armazenamento.^{13,22} Também não foram observadas diferenças na viabilidade celular entre o leite em pó e o leite de soja.⁴⁴ Atualmente, estudos sugerem o leite de soja como meio de armazenamento,^{3,21} apresentando resultados semelhantes a HBSS após 8 e 24 horas de armazenamento^{21,44,45} e ao leite integral após 24 horas.^{3,45}

Quanto ao leite desnatado, em temperatura ambiente, apresenta menor capacidade para manter a viabilidade do LP em comparação com o leite em pó e leite de soja, após 15 minutos. Aos 30 e 45 minutos apresenta viabilidade semelhante ao leite em pó e inferior ao leite de soja.⁴⁶ Outro estudo demonstrou que o leite desnatado foi o melhor meio de armazenamento, em comparação a

HBSS, com capacidade para 24 e 48 horas nas temperaturas de 37° e 20°, respectivamente.³⁰

Quanto ao leite pasteurizado, apresenta a vantagem de ser submetido a um processo de pasteurização para eliminação de bactérias, entretanto apresenta a mesma capacidade de manutenção do LP que o leite longa vida integral. Porém necessita de refrigeração, tornando-o menos acessível no momento do trauma. Após 8 horas, o leite longa vida e pasteurizado, apresentam capacidade superior a HBSS.⁴⁷ Em recente estudo *in vitro* para determinar a eficácia de vários substitutos do leite em relação ao leite integral, demonstrou-se que o leite pasteurizado apresentou resultado inferior ao leite integral, após 2 horas. A formulação de leite para crianças (Enfamil[®]) apresentou melhor desempenho que o leite integral até 4 horas. Por sua vez, o leite integral longa vida promoveu melhor viabilidade celular em relação aos substitutos (leite em pó, pasteurizado e Enfamil[®]), após 8 horas.¹³

O soro do leite é constituído quase que integralmente dos aminoácidos, dos peptídeos bioativos, cálcio e dos fatores de crescimento presentes no leite. Esses componentes conferem-lhe propriedades antimicrobiana, antioxidante, reguladora da síntese proteica e da função imunológica.^{32-39,48} Além da capacidade de estimular a proliferação (mitogênese) de células epiteliais, fibroblástica e osteoblásticas.^{37,38} Sendo assim, essas propriedades assemelham-se as do leite bovino, as quais atendem as exigências de um adequado meio de armazenamento para dentes avulsionados. Por esta razão e pela busca incessante por um novo meio de estocagem que ao menos se assemelhe ao leite ou apresente capacidade de estocagem superior, foi proposta a análise do soro do leite.

Quanto aos resultados encontrados no presente estudo, considerando o ligamento periodontal observou-se menor organização no Grupo IV (Tardio) em relação aos demais grupos ($p=0,0001$). O Grupo II (Soro do leite) não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao Grupo I (Imediato) e ao Grupo III (Leite UHT) ($P>0,05$). Contudo, observou-se a presença de espécimes neste grupo com fibras periodontais inseridas no osso e no cimento em toda a extensão do LP em semelhança ao reimplante imediato, enquanto esse aspecto histológico não foi visualizado no Grupo III (Leite UHT). Em comparação aos resultados aqui descritos, estudos demonstram semelhança entre o reimplante imediato e tardio mantido no leite.^{3,18,19,49} Acredita-se que a reparação do LP no Grupo II (Soro do leite) tenha ocorrido em decorrência da capacidade dessa solução de manter as células do LP cementário viáveis. Este resultado pode ser explicado pelo fato do soro do leite apresentar propriedades similares ao leite.^{32-39,48} Os resultados aqui obtidos com o reimplante tardio também estão em concordância com outros estudos, atestando-se que a ausência do LP cementário provoca um considerável atraso no reparo periodontal.^{3,19,22,31}

Quanto à intensidade e à extensão da inflamação aguda no ligamento periodontal o Grupo I (Imediato) apresentou melhor resultado em comparação com o Grupo IV (Tardio) ($p=0,0025$), não se diferenciando, estatisticamente do Grupo II (Soro do Leite) e Grupo III (Leite UHT) ($P>0,05$). Resultados semelhantes foram também descritos por demais autores.^{3,7,8,50} O reimplante imediato apresenta prognóstico mais favorável, em razão da manutenção da viabilidade das células do LP cementário.^{19,43}

Quando foram analisados a extensão e profundidade da reabsorção o Grupo IV (Tardio) apresentou maior dano em relação aos demais grupos ($p=0,0001$), como já terminantemente descrito.¹⁸ O Grupo II (Soro do leite) não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao Grupo I (Imediato) e III (Leite UHT) ($P>0,05$). O leite integral, pela capacidade de manter a viabilidade das células do LP, apresenta quadros de reabsorção radicular mais favoráveis, principalmente com relação à reabsorção inflamatória.^{22,43,49} Entretanto autores apresentam resultados contraditórios, ao demonstrarem maiores áreas de reabsorção radicular no reimplante tardio mantido no leite em comparação ao imediato.¹⁸ Os achados histológicos reiteram com vários estudos que atestam a efetividade do leite como meio de estocagem.^{13,22,45,47,49,50,51} A capacidade do soro do leite de manter as células do LP, como já aqui descrita, é inerente as suas propriedades, as quais de forma geral assemelham-se as do leite.

Por sua vez, quando o processo de reparo radicular foi observado o Grupo III (Leite UHT) apresentou um reparo radicular mais favorável que o Grupo II (Soro do Leite) e Grupo IV (Tardio) ($p=0,0001$) e, não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado com o Grupo I (Imediato) ($P>0,05$). Esperava-se que o Grupo I (Imediato) apresentasse um reparo radicular mais favorável que os demais grupos, de acordo com relatos.^{18,22,52}

Considerando a reabsorção de tecido ósseo, embora não tenha ocorrido diferença estatisticamente significativa entre o Grupo IV (Tardio) e o Grupo I (Imediato) ($P>0,05$), a análise histológica demonstrou que parte dos espécimes do reimplante tardio apresentaram ora ausência ou ora pequenas áreas de

reabsorção óssea. Em contrapartida, não se constatou a presença de reabsorção óssea no Grupo I (imediate). Os dados histológicos obtidos estão em consonância com a literatura.^{22,53} O Grupo II (Soro do leite), embora apresente diferença estatisticamente significativa quando confrontado com o Grupo I (Imediato) e Grupo III (Leite UHT) ($p=0,0001$), foram observadas poucas e apenas pequenas áreas de reabsorção óssea.

Quanto à anquilose, embora não se tenha identificado com o teste estatístico diferenças entre os grupos, provavelmente exista entre os Grupo II (Soro do leite) e III (Leite UHT) em comparação aos demais. A análise histológica em confronto com o Grupo II (Soro do leite) e III (Leite UHT) demonstrou que grande parte dos espécimes de cada grupo apresentaram ora ausência ou ora presença de pequenos pontos de anquilose. A literatura científica enfatiza a baixa incidência de anquilose em dentes avulsionados mantidos no leite.^{31,43,49} Enquanto o reimplante I (imediate) e IV (Tardio) não apresentaram áreas de anquilose, como demonstrado em alguns estudos.^{46,52} Os resultados histológicos do Grupo IV (Tardio) divergem de outros estudos que apontam altas incidências de reabsorção por substituição e anquilose.^{6,18,22,31,49,53,54}

Considerando o aspecto da polpa dentária, como esperado, as análises histológicas revelam que os melhores resultados foram visualizados com o reimplante imediato em comparação com o reimplante tardio ($p=0,0024$). Consagrando dessa forma, o que autores afirmam do processo de reparação pulpar ser inversamente proporcional ao período extra-alveolar.⁵⁵

Quanto aos resultados aqui obtidos, destaca-se a organização do ligamento periodontal após o reimplante tardio mantido no soro do leite. Não

podemos deixar de salientar as propriedades antioxidante, antiinflamatória e antimicrobiana do soro do leite. Embora o pH e a osmolaridade fisiológicos sejam imprescindíveis para a manutenção da viabilidade das células do LP, autores afirmam que a composição de uma solução é também fator determinante.⁵⁶ Recentes estudos tem demonstrado que a capacidade antioxidativa de uma solução pode estar relacionada ao mecanismo de manutenção da vitalidade das células do LP, assim como o reparo periodontal é atribuído as condições antimicrobiana e antiinflamatória.^{27,29}

O soro do leite é uma rica fonte de fatores de crescimento, estudo *in vitro* tem demonstrado o benefícios desses fatores no processo de reparo tecidual, ao estimular a proliferação celular (mitogênese) de células fibroblástica.³⁷ Observou-se aumento da capacidade mitogênica e clonogênica de células fibroblástica do LP de dentes avulsionados mantidos em diversos meios de estocagem suplementados com fatores de crescimento.^{26,57} Dentro das limitações deste estudo, acredita-se que o mesmo efeito possa ter ocorrido nas células do LP mantidos no soro do leite.

O potencial promissor do soro do leite em virtude de suas propriedades e os resultados obtidos neste trabalho dão início a novas perspectivas de estudos sobre o efeito do soro do leite nas células do ligamento periodontal de dentes avulsionados.

Em suma, contemplando a organização do ligamento periodontal, no qual o Grupo II (Soro do leite) apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao Grupo IV (tardio) e ausência de diferença entres os Grupos I (Imediato) e III (Leite UHT); assim como em relação a extensão e a profundidade de reabsorção, os quais foram encontrados diferença

estatisticamente significativa apenas para o Grupo IV (Tardio) e não entre os demais grupos; e, o processo de reparo radicular, no qual foi observado que o Grupo II (Soro do leite) apresentou-se menor em comparação com o Grupo III (Leite UHT), porém não apresentou diferença em relação ao grupo I (Imediato) é possível julgar que o soro do leite pode ser apontado como uma opção de meio de estocagem para dentes avulsionados.



Conclusão

6 Conclusão

Pode-se concluir que o soro do leite pode ser utilizado como meio de estocagem para manutenção da vitalidade das células do ligamento periodontal de dentes avulsionados.



Referências

Referências

1. Andreasen JO, Andreasen FM, Andersson L. Textbook and color atlas of traumatic injuries to the teeth, 4th edn. Oxford: Blackwell; 2007.
2. Andersson L, Bodin I. Avulsed human teeth replanted within 15 minutes—a long-term clinical follow-up study. *Endod Dent Traumatol* 1990;6:37–42.
3. Moura CC, Soares PB, de Paula Reis MV, Fernandes Neto AJ, Zanetta Barbosa D, Soares CJ. Potential of coconut water and soy milk for use as storage media to preserve the viability of periodontal ligament cells: an in vitro study. *Dental Traumatol* 2014;30:22–6.
4. 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.
5. Trope M. Avulsion of permanent teeth: theory to practice. *Dent Traumatol* 2011;27:281–94.
6. Andreasen JO. Effect of extra-alveolar period and storage media upon periodontal and pulpal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Int J Oral Surg* 1981;10:43-53.

* As referências no texto estão de acordo com as normas da revista *Dental Traumatology*, para qual o trabalho será enviado.

7. Lekic PC, Kenny DC, Barrett EJ. The influence of storage conditions on the clonogenic capacity of periodontal ligament cells: implications for tooth replantation. *Int Endod J* 1998;31:137-40.
8. Ashkenazi M, Sarnat H, Keila S. In vitro viability, mitogenicity and clonogenic capacity of periodontal ligament cells after storage in six different media. *Endod Dent Traumatol* 1999;15:149-56.
9. Zhan X, Zhang C, Dissanayaka WL, Cheung GSP, Jin L, Yang Y, *et al*. Storage media enhance osteoclastogenic potential of human periodontal ligament cells via RANKL-independent signaling. *Dent Traumatol* 2013;29:59-65.
10. 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.
11. Jamalpour MR, Soltanian AR, Tootunchi AS, Roshanipaian M. Temporary preservation of avulsed tooth in oral submucosal tissue: an experimental study in cat. *Dent Traumatol* 2014;30:265-9.
12. Sonoda CK, Poi WR, Panzarini SR, Sottovia AD, Okamoto T. Tooth replantation after keeping the avulsed tooth in oral environment: case report of a 3-year follow-up. *Dent Traumatol* 2008;24:373-6.
13. Pearson RM, Liewehr FR, West LA, Patton WR, McPherson JC, Runner RR. Human periodontal ligament cell viability in milk and milk substitutes. *J Endod* 2003;29:184-6.

14. Ricieri CB, Sonoda CK, Aranega AM, Panzarini SR, Poi WR, Sundefeld MLMM, *et al.* Healing process of incisor teeth of diabetic rats replanted after storage in milk. *Dent Traumatol* 2009;25:284-9.
15. Souza BDM, Bortoluzzi EA, da Silveira Teixeira C, Felipe WT, Simões CM, Felipe MC. Effect of HBSS storage time on human periodontal ligament fibroblast viability. *Dent Traumatol* 2010;26:481-3.
16. Ashkenazi M, Marouni M, Sarnat H. In vitro viability, mitogenicity and clonogenic capacity of periodontal ligament cells after storage in four media at room temperature. *Endod Dent Traumatol* 2000;16:63-70.
17. Gopikrishna V, Thomas T, Kandaswamy D. A quantitative analysis of coconut water: a new storage media for avulsed teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:61-5.
18. Sottovia AD, Sottovia Filho D, Poi WR, Panzarini SR, Luize DS, Sonoda CK. Tooth replantation after use of Euro-Collins solution or bovine milk as storage medium: a histomorphometric analysis in dogs. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68:111-9.
19. Rajendran P, Varghese NO, Varughese JM, Murugaian E. Evaluation, using extracted human teeth, of Ricetral as a storage medium for avulsions- an in vitro study. *DentTraumatol* 2011;27:217-20.
20. Hwang JY, Choi SC, Park JH, Kang SW. The use of green tea extract as a storage medium for the avulsed tooth. *J Endod* 2011;37:962-7.
21. Silva EJ, Rollemberg CB, Coutinho-Filho TS, Krebs RL, Zaia AA. Use of soymilk as a storage medium for avulsed teeth. *Acta Odontol Scand* 2013;71:1101-4.

22. Dos Santos CLV, Sonoda CK, Poi WR, Panzarani SR, Sundefeld MLMM, Negri MR. Delayed replantation of rat teeth after use of reconstituted powdered milk as a storage medium. *Dent Traumatol* 2009;25:51-7.
23. Casaroto AR, Hidalgo MM, Sell AM, Franco SL, Cuman RKN, Moreschi E, *et al.* Study of the effectiveness of propolis extract as a storage medium for avulsed teeth. *Dent Traumatol* 2010;26:323-3.
24. Harkacz OM, Carnes DL, Walker WA. Periodontal ligament cell viability in the oral rehydration fluid Gatorade and milks of varying fat content. *J Endod* 1997;23:687-90.
25. Al- Nazhan S, Al- Nasser A, Viability of human periodontal ligament fibroblasts in tissue culture after exposure to different contact lens solutions. *J Contemp Dent Pract* 2006;7:1-8.
26. Ashkenazi M, Marouni M, Sarnat H. In vitro viability mitogenicity and clonogenic capacities of periodontal ligament fibroblasts after storage in four media supplemented with growth factors. *Dent Traumatol* 2001;17:27-35.
27. Buttke TM, Trope M. Effect of catalase supplementation in storage media for avulsed teeth. *Dent Traumatol* 2003;19:103-8.
28. Raja S, Byakod G, Pudukalkatti P. Growth factors in periodontal regeneration. *Int J Dent Hyg* 2009;7:82-9.
29. Chen H, Huang B. (-)-Epigallocatechin-3-gallate: a novel storage medium for avulsed teeth. *Dent Traumatol* 2012;28:158-60.
30. Souza BDM, Luckemeyer DD, Felipe WT, Simões CMO, Felipe MCS. Effect of temperature and storage media on human periodontal ligament fibroblast viability. *Dent Traumatol* 2010;26:271-5.

31. Khademi AA, Atbaee A, Razavi SM, Shabanian M. Periodontal healing of replanted dog teeth stored in milk and egg albumen. *Dent Traumatol* 2008;24:510-4.
32. Sgarbieri VC. Physiological-functional properties of milk whey proteins. *Rev Nutr* 2004;17:397-409.
33. Haraguchi FK, De Abreu WC, De Paula H. Whey protein: composition, nutritional properties, applications in sports and benefits for human health. *Rev Nutr* 2006;19:479-88.
34. Madureira AR, Pereira CI, Gomes AMP, Pintado ME, Malcata FX. Bovine whey proteins – overview on their main biological properties. *Food Res. Int* 2007;40:1197-211.
35. Marshall K. Therapeutic applications of whey protein. *Altern Med Rev* 2004;9:136-56.
36. Michaelidou A, Steijn J. Nutritional and technological aspects of minor bioactive components in milk and whey: Growth factors, vitamins and nucleotides. *Int Dairy J* 2006;16:1421-6.
37. Rayner TE, Cowin AJ, Robertson G, Cooter RD, Harries RC, Regester GO, *et al.* Mitogenic whey extract stimulates wound repair activity in vitro and promotes healing of rat incisional wounds. *Am J Physiol Regul Integr. Comp Physiol* 2000;278:1651-60.
38. Toba Y, Takada Y, Matsuoka Y, Morita Y, Motouri M, Hirai T, *et al.* Milk basic protein promotes bone formation and suppresses bone resorption in healthy adult men. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001;65:1353-7.

39. Madureira AR, Tavares T, Gomes AM, Pintado ME, Malcata FX. Invited review: physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *J Dairy Sci* 2010;93:437-55.
40. Wolfson EM, Seltzer S. Reaction of rat connective tissue to some gutta-percha formulations. *J Endod* 1975;1:395-402.
41. Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors 1. Diagnosis of healing complications. *Endod Dent Traumatol* 1995;11:51-8.
42. Panzarini SR, Okamoto R, Poi WR, Sonoda CK, Pedrini D, da Silva PE, *et al*. Histological and immunohistochemical analyses of the chronology of healing process after immediate tooth replantation in incisor rat teeth. *Dent Traumatol* 2013;29:15-22.
43. Trope M, Friedman S. Periodontal healing of replanted dog teeth stored in Viaspan, milk and Hank's balanced salt solution. *Endod Dent Traumatol* 1992;8:183-8.
44. Moazami F, Mirhadi H, Geramizadeh B, Sahebi S. Comparison of soymilk, powdered milk, Hank's balanced salt solution and tap water on periodontal ligament cell survival. *Dent Traumatol* 2012;28:132-5.
45. Silva EJ, Rollemberg CB, de Souza Coutinho-Filho T, Zaia AA. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of soymilk with different storage media. *Dent Traumatol* 2013;29:319-22.
46. Moura CC, Soares PB, Reis MV, Fernandes Neto AJ, Soares CJ. Soymilk as a storage medium to preserve human fibroblast cell viability: an in vitro study. *Braz Dent J* 2012;23:559-63.
47. Marino TG, West LA, Liewehr FR, Mailhot JM, Buxton TB, Runner RR, *et*

- al.* Determination of periodontal ligament cell viability in long shelf-life milk. J Endod 2000;26:699-702.
48. Geoffrey WS, Whey and whey proteins – “From gutter-to-gold”. Int Dairy J 2008;18:695-704.
49. Blomlof L, Lindskog S, Andersson L, Hedstrom KG, Hammarstrom L. Storage of experimentally avulsed teeth in milk prior to replantation. J Dent Res 1983;62:912–6.
50. Blomlöf L, Andersson L, Lindskog S, Hedström KG, Hammarström L. Periodontal healing of replanted monkey teeth prevented from drying. Acta Odontol Scand 1983;41:117-23.
51. Souza B, Lückemeyer DD, Reyes-Carmona JF, Felipe WT, Simões CM, Felipe MC. Viability of human periodontal ligament fibroblasts in milk, Hank's balanced salt solution and coconut water as storage media. Int Endod J 2011;44:111-5.
52. Mori GG, Nunes DC, Castilho LR, de Moraes IG, Poi WR. Propolis as storage media for avulsed teeth: microscopic and morphometric analysis in rats. Dent Traumatol 2010;26:80-5.
53. Andreasen JO, Kristerson L. The effect of limited drying or removal of the periodontal ligament. Periodontal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. Acta Odontol Scand 1981;39:1-13.
54. Hidalgo MM, Itano EN, Consolaro A: Humoral immune response of patients with dental trauma and consequent replacement resorption. Dent Traumatol 2005;21:218-21.
55. Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 2. Factors related to pulpal healing.

Endod Dent Traumatol 1995;11:59-68.

56. Lindskog S, Blomlof L. Influence of osmolality and composition of some storage media on human periodontal ligament cells. Acta Odontol Scand 1982;40:435-41.
57. Sonmez AB, Castelnovo J. Applications of basic fibroblastic growth factor (FGF-2, bFGF) in dentistry. Dent Traumatol 2014;30:107-11.



Anexo

Anexo A

Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)

	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" Campus de Araçatuba
Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)	
CERTIFICADO	
Certificamos que o Projeto "Análise histomorfométrica do processo de reparo após o reimplante de dentes de rato mantidos em soro do leite bovino e leite integral" sob responsabilidade do Pesquisador WILSON ROBERTO POI e colaboração de Sônia Regina Panzarini, Celso Koogi Sonoda, Elizane Ferreira Hamanaka e Ana Paula Simões Corrêa está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo FOA-00845-2013.	
CERTIFICATE	
We certify that the research "Histomorphometrical analysis of the healing process after replantation of rat teeth maintained in bovine milk whey and milk", process number FOA-00845-2013, under responsibility of WILSON ROBERTO POI and with collaboration of Sônia Regina Panzarini, Celso Koogi Sonoda, Elizane Ferreira Hamanaka and Ana Paula Simões Corrêa agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.	
 Prof. Adj. MARY MARCONDES Vice-Coordenadora da CEUA CEUA Vice-Coordinator	
Faculdade de Odontologia e Faculdade de Medicina Veterinária Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 – Vila Mendonça Tel (18) 3636-3234 Fax (18) 3636-3333 E-mail: cervolino@foa.unesp.br	

Anexo B

Normas da revista selecionada para publicação do artigo



Edited By: Lars Andersson

Impact Factor: 1.214

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2013: 45/82
(Dentistry Oral Surgery & Medicine)

Online ISSN: 1600-9657

Content of Author Guidelines: 1. General, 2. Ethical Guidelines, 3. Submission of Manuscripts, 4. Manuscript Types Accepted, 5. Manuscript Format and Structure, 6. After Acceptance.

Useful Websites: Submission Site, Articles published in Dental Traumatology, Author Services, Wiley-Blackwell's Ethical Guidelines, Guidelines for Figures

1. GENERAL

Dental Traumatology is an international 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 and techniques and case reports. The journal focuses on the following areas related to dental trauma:

Epidemiology and Social Aspects

Tissue, Periodontal, and Endodontic Considerations

Pediatrics and Orthodontics

Oral and Maxillofacial Surgery / Transplants/ Implants

Esthetics / Restorations / Prosthetics

Prevention and Sports Dentistry

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in *Dental Traumatology*. Authors are encouraged to visit Wiley-Blackwell Author Services for further information on the preparation and submission of articles and figures.

2. ETHICAL GUIDELINES

Dental Traumatology adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

2.1. Authorship and Acknowledgements

Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript have been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the

manuscript to the Journal. ALL named authors must have made an active contribution to the conception and design and/or analysis and interpretation of the data and/or the drafting of the paper and ALL must have critically reviewed its content and have approved the final version submitted for publication. Participation solely in the acquisition of funding or the collection of data does not justify authorship.

Dental Traumatology adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited.

2.2. Ethical Approvals

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration (version, 2008 <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. In the online submission process we also require that all authors submitting manuscripts to *Dental Traumatology* online must answer in the affirmative to a statement 'confirming that all research has been carried out in accordance with legal requirements of the study country such as approval of ethical committees for human and/or animal research or other legislation where applicable.' Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

2.3 Clinical Trials

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.

All manuscripts reporting results from a clinical trial must indicate that the trial was fully registered at a readily accessible website, e.g., www.clinicaltrials.gov.

2.4 DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations

Papers reporting protein or DNA sequences and crystallographic structure determinations will not be accepted without a Genbank or Brookhaven accession number, respectively. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

2.5 Conflict of Interest

Dental Traumatology requires that sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Acknowledgements should be brief and should not include thanks to anonymous referees and editors. The Conflict of Interest Statement should be included as a separate document uploaded under the file designation 'Title Page' to allow blinded review.

2.6 Appeal of Decision

The decision on a paper is final and cannot be appealed.

2.7 Permissions

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain

these in writing and provide copies to the Publishers.

2.8 Copyright Transfer Agreement

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

For authors signing the copyright transfer agreement If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs.

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work and its essential substance have not been published before and is not being considered for publication elsewhere. The submission of the manuscript by the authors means that the authors automatically agree to assign exclusive copyright to Wiley-Blackwell if and when the manuscript is accepted for publication. The work shall not be published elsewhere in any language without the written consent of the publisher. The articles published in this journal are protected by copyright, which covers translation rights and the exclusive right to reproduce and distribute all of the articles printed in the journal. No material published in the journal may be stored on microfilm or videocassettes or in electronic database and the like or reproduced photographically without the prior written permission of the publisher.

Upon acceptance of a paper, authors are required to assign the copyright to publish their paper to Wiley-Blackwell. Assignment of the copyright is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless copyright has been assigned. Papers subject to government or Crown copyright are exempt from this requirement; however, the form still has to be signed. A completed Copyright Transfer Agreement must be completed online before any manuscript can be published upon receiving notice of manuscript acceptance.

Kuthsiyya Peer Mohamed

Production Editor

John Wiley & Sons Singapore Pte Ltd

1 Fusionopolis Walk,

#07-01 Solaris South Tower,

Singapore 138628

Email: edt@wiley.com

Fax: +65 6643 8599

2.9 OnlineOpen

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the

author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/dt>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. Further assistance can be obtained from Editorial Assistant Karin Andersson at dtooffice@qualitynet.net.

3.1. Getting Started

- Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 6 or higher, Netscape 7.0, 7.1, or 7.2, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4) and go to the journal's online Submission Site: <http://mc.manuscriptcentral.com/dt>.
- Log-in or click the 'Create Account' option if you are a first-time user.
- If you are creating a new account.
 - After clicking on 'Create Account', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
 - Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'
 - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your area of expertise. Click 'Finish'.
- If you have an account, but have forgotten your log in details, go to Password Help on the journals online submission system <http://mc.manuscriptcentral.com/dt> and enter your e-mail address. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.
- Log-in and select 'Author Centre.'

3.2. Submitting Your Manuscript • After you have logged into your 'Author Centre', submit your manuscript by clicking the submission link under 'Author Resources'.

- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
- You are required to upload your files.
 - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
 - Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button.
 - When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
- To allow double blinded review, please submit (upload) your main manuscript and title page as separate files. Please upload:
 - Your manuscript without title page under the file designation 'main document'
 - Figure files under the file designation 'figures'.
 - The title page, Acknowledgements and Conflict of Interest Statement where applicable, should be uploaded under the file designation 'title page'
- Review your submission (in HTML and PDF format) before completing your submission by sending it to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing. All documents uploaded under the file designation 'title page' will not be viewable in the html and pdf format you are asked to review in the end of the submission process. The files viewable in the html and pdf format are the files available to the reviewer in the review process.

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files uploaded as main manuscript documents will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The files uploaded as title page will be blinded from review and not converted into HTML and PDF. The main manuscript document file must contain the entire manuscript including abstract, text, references, tables, and figure legends, but *no* embedded figures. In the text, please reference figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

3.4. Blinded Review

All manuscripts submitted to *Dental Traumatology* will be reviewed by two experts in the field. *Dental Traumatology* uses double blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a 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.

Please upload:

- Your manuscript without title page under the file designation 'main document'
- Figure files under the file designation 'figures'
- The title page, Acknowledgements and Conflict of Interest Statement where applicable, should be uploaded under the file designation 'title page'

All documents uploaded under the file designation 'title page' will not be viewable in the html and pdf format you are asked to review in the end of the submission process. The files viewable in the html and pdf format are the files available to the reviewer in the review process.

3.5. Suggest a Reviewer

Dental Traumatology attempts to keep the review process as short as possible to enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process, please suggest the names and current email addresses of a potential international reviewer whom you consider capable of reviewing your manuscript. In addition to your choice the journal editor will choose one or two reviewers as well. When the review is done you will be notified under 'Manuscripts with decision' and through e-mail.

3.6. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

3.7. E-mail Confirmation of Submission

After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation e-mail after 24 hours, please check your e-mail address carefully in the system. If the e-mail address is correct please contact your IT department. The error may be caused by some sort of spam filtering on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our e-mail server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

3.8. Manuscript Status

You can access ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) any time to check your 'Author Center' for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

3.9. Submission of Revised Manuscripts

To submit a revised manuscript, locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision'. Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript. Please also remember to upload

your manuscript document separate from your title page.

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

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, Tissue, Periodontal, and Endodontic Considerations, Pediatrics and Orthodontics, Oral and Maxillofacial Surgery/ Transplants / Implants, Esthetics / Restorations / Prosthetics and Prevention and Sports Dentistry.

Review Papers: *Dental Traumatology* commissions review papers of comprehensive areas and mini reviews of small areas. 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 preparation and submission. Comprehensive review articles should include a description of search strategy of relevant literature, inclusion criteria, evaluation of papers and level of evidence.

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

Case Reports: *Dental Traumatology* accepts Case Reports but these will only be published online and will not be included in the printed version unless specifically requested by the Editor-in-Chief.

Case Reports illustrating unusual and clinically relevant observations are acceptable, but their merit needs to provide high priority for publication in the journal. They should be kept within 3-4 printed pages and need not follow the usual division into material and methods etc, but should have an abstract. The introduction should be kept short. Thereafter the case is described followed by a discussion.

Short Communications of 1-2 pages are accepted for quick 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 a high scientific and a high clinical practice standard.

Letters to the Editor, if of broad interest, are encouraged. They may deal with material in papers published in *Dental Traumatology* or they may raise new issues, but should have important implications.

Meetings: advance information about and reports from international meetings are welcome, but should not be submitted via the online submission site, but send directly to the journal administrator Karin Andersson at dtooffice@qualitynet.net

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. It is preferred that manuscript is professionally edited. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

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 and written out completely in the text when first used. 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.

Font: When preparing your file, please use only standard fonts such as Times, Times

New Roman or Arial for text, and Symbol font for Greek letters, to avoid inadvertent character substitutions. In particular, please do not use Japanese or other Asian fonts. Do not use automated or manual hyphenation. Use double spacing when writing.

5.2. Structure

All papers submitted to *Dental Traumatology* should include: Title Page, Abstract, Main text, References and Tables, Figures, Figure Legends, Conflict of Interest Statement and Acknowledgements where appropriate. Title page, Conflict of Interest Statement and any Acknowledgements must be submitted as separate files and uploaded under the file designation Title Page to allow blinded review. Manuscripts must conform to the journal style. Manuscripts not complying with the journal style will be returned to the author(s).

Title Page: should be uploaded as a separate document in the submission process under the file designation 'Title Page' to allow blinded review. It should include: Full title of the manuscript, author(s)' full names (Family names should be underlined) and institutional affiliations including city, country, and the name and address of the corresponding author. If the author does not want the e-mail address to be published this must be clearly indicated. The title page should also include a running title of no more than 60 characters and 3-6 keywords.

Abstract is limited to 250 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 the essential purpose and message of the paper in an abbreviated form. For original articles the abstract should be structured with the following headings: Background/Aim, Material and Methods, Results and Conclusions. For other article types, please choose headings appropriate for the article.

Main Text of Original Articles should be divided into Introduction, Material and Methods, Results and Discussion. 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. Authors should number all of the pages consecutively.

Introduction should be focused, outlining the historical or logical origins of the study and not summarize the results; 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 the explicit statement of the specific aims of the investigation or hypothesis tested.

Materials and Methods 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 modify methods. Identify precisely all drugs used including generic names and route of administration.

(i) 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. All manuscripts reporting results from a clinical trial must indicate that the trial was fully registered at a readily accessible website, e.g., www.clinicaltrials.gov.

(ii) Experimental subjects: experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration (version, 2008 <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been

independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

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

Results should present the observations with minimal reference to earlier literature or to possible interpretations. Present your results in 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 may usually start with a brief summary of the major findings, but repetition of parts of the Introduction or of the Results sections should be avoided. The section should end with a brief conclusion and a comment on the potential clinical relevance of the findings. Link the conclusions to the aim of the study. Statements and interpretation of the data should be appropriately supported by original references.

Main Text of Review Articles comprises an introduction and a running text structured in a suitable way according to the subject treated. A final section with conclusions may be added.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledgements should be brief and should not include thanks to anonymous referees and editors.

Conflict of Interest Statement: All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. The Conflict of Interest Statement should be included as a separate document uploaded under the file designation 'Title Page' to allow blinded review.

5.3. References As the Journal follows the Vancouver system for biomedical manuscripts, the author is referred to the publication of the International Committee of Medical Journal Editors: Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Int Med* 1997;126:36-47.

Number references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. Identify references in texts, tables, and legends by Arabic numerals (in parentheses). Use the style of the examples below, which are based on the format used by the US National Library of Medicine in Index Medicus. For abbreviations of journals, consult the 'List of the Journals Indexed' printed annually in the January issue of Index Medicus. We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting. EndNote reference styles can be searched for here: www.endnote.com/support/enstyles.asp. Reference Manager reference styles can be searched for here: www.refman.com/support/rmstyles.asp.

Anexo C

Ilustrações das fases cirúrgicas da metodologia experimental.



Figura 17 - Incisivos superiores.



Figura 18- sindesmotomia e luxação.



Figura 19 - Extração dentária.



Figura 20- Dente extraído.



Figura 21- Dente extraído mantido no soro do leite.



Figura 22- Reimplante.

Tabela 1. Valor de (p) obtido após o teste Kruskal-Wallis comparando os quatro grupos.

Evento histológico	Valor de p	Diferença estatística significativa	Grupos que apresentaram diferença após teste de Dunn
Local de inserção	-		Todos os resultados semelhantes
Processo inflamatório agudo - intensidade	0,066		-
Processo inflamatório agudo - extensão	0,0001	*	SORO DO LEITE vs TARDIO SORO DO LEITE vs IMEDIATO SORO DO LEITE vs LEITE UHT
Processo inflamatório crônico - intensidade	0,0001	*	SORO DO LEITE vs TARDIO SORO DO LEITE vs IMEDIATO SORO DO LEITE vs LEITE UHT
Processo inflamatório crônico - extensão	0,0001	*	SORO DO LEITE vs TARDIO SORO DO LEITE vs IMEDIATO SORO DO LEITE vs LEITE UHT
Ligamento periodontal - organização	0,0001	*	SORO DO LEITE vs TARDIO TARDIO vs IMEDIATO TARDIO vs LEITE UHT
Ligamento periodontal inflamação aguda - intensidade	0.0025	*	TARDIO vs IMEDIATO
Ligamento periodontal inflamação aguda - extensão	0,0006	*	TARDIO vs IMEDIATO
Ligamento periodontal inflamação crônica - intensidade	0,0001	*	SORO DO LEITE vs TARDIO SORO DO LEITE vs IMEDIATO SORO DO LEITE vs LEITE UHT
Ligamento periodontal inflamação crônica - extensão	0,0001	*	SORO DO LEITE vs TARDIO SORO DO LEITE vs IMEDIATO SORO DO LEITE vs LEITE UHT
Raiz dentária - reabsorção	0.0001	*	TARDIO vs IMEDIATO TARDIO vs LEITE UHT
Raiz dentária - extensão reabsorção	0.0001	*	TARDIO vs IMEDIATO TARDIO vs LEITE UHT TARDIO vs SORO DO LEITE
Raiz dentária - profundidade reabsorção	0,0001	*	TARDIO vs IMEDIATO TARDIO vs SORO DO LEITE TARDIO vs LEITE UHT
Raiz dentária - reparo	0,0001	*	SORO DO LEITE vs LEITE UHT TARDIO vs LEITE UHT
Tecido ósseo - reabsorção	0,0001	*	SORO DO LEITE vs IMEDIATO SORO DO LEITE vs LEITE UHT
Tecido ósseo - anquilose	0.0012	*	O teste estatístico não permite apontar entre quais grupos há diferença pois 2 dos grupos não apresentou variação
Polpa	0,0024	*	TARDIO vs IMEDIATO

Tabela 2 – Valores numéricos dos eventos histomorfológicos e escores obtidos nos quatro grupos experimentais.

Grupos	Reimplante imediato				Soro do leite				Leite UHT				Reimplante Tardio			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Eventos histomorfológicos	Escores															
Inserção epitelial																
Área (local de inserção)	9/9	0/9	0/9	0/9	9/9	0/9	0/9	0/9	9/9	0/9	0/9	0/9	9/9	0/9	0/9	0/9
Intensidade do infiltrado inflamatório agudo	0/9	9/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	1/9	8/9	0/9	0/9	0/9	8/9	1/9	0/9
Extensão do infiltrado inflamatório agudo	0/9	9/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	9/9	1/9	8/9	0/9	0/9	0/9	8/9	1/9	0/9
Intensidade do infiltrado inflamatório crônico	9/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	3/9	9/9	0/9	0/9	0/9	9/9	0/9	0/9	0/9
Extensão do infiltrado inflamatório crônico	9/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	9/9	9/9	0/9	0/9	0/9	9/9	0/9	0/9	0/9
Ligamento periodontal																
Organização	6/9	3/9	0/9	0/9	3/9	2/9	3/9	1/9	0/9	9/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	9/9
Intensidade do infiltrado inflamatório agudo	9/9	0/9	0/9	0/9	7/9	0/9	0/9	2/9	3/9	6/9	0/9	0/9	1/9	5/9	3/9	0/9
Extensão do infiltrado inflamatório agudo	9/9	0/9	0/9	0/9	7/9	2/9	0/9	0/9	4/9	5/9	0/9	0/9	1/9	6/9	1/9	1/9
Intensidade do infiltrado inflamatório crônico	9/9	0/9	0/9	0/9	2/9	3/9	4/9	0/9	9/9	0/9	0/9	0/9	9/9	0/9	0/9	0/9
Extensão do infiltrado inflamatório crônico	9/9	0/9	0/9	0/9	2/9	4/9	3/9	0/9	9/9	0/9	0/9	0/9	9/9	0/9	0/9	0/9
Reabsorção radicular ativa e inativa	2/9	2/9	5/9	0/9	0/9	2/9	4/9	3/9	1/9	7/9	1/9	0/9	0/9	0/9	0/9	9/9
Extensão da reabsorção radicular	2/9	7/9	0/9	0/9	2/9	3/9	4/9	0/9	1/9	8/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	9/9
Profundidade da reabsorção radicular	2/9	7/9	0/9	0/9	2/9	3/9	4/9	0/9	1/9	8/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	9/9
Reparo da reabsorção radicular	1/9	1/9	4/9	3/9	0/9	0/9	0/9	9/9	4/9	5/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	9/9
Tecido ósseo reabsorção	9/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	9/9	0/9	9/9	0/9	0/9	0/9	3/9	0/9	6/9	0/9
Tecido ósseo anquilose	9/9	0/9	0/9	0/9	3/9	3/9	2/9	1/9	4/9	5/9	0/9	0/9	9/9	0/9	0/9	0/9
Polpa	2/9	0/9	5/9	2/9	0/9	0/9	9/9	0/9	2/9	0/9	2/9	5/9	0/9	0/9	0/9	9/9