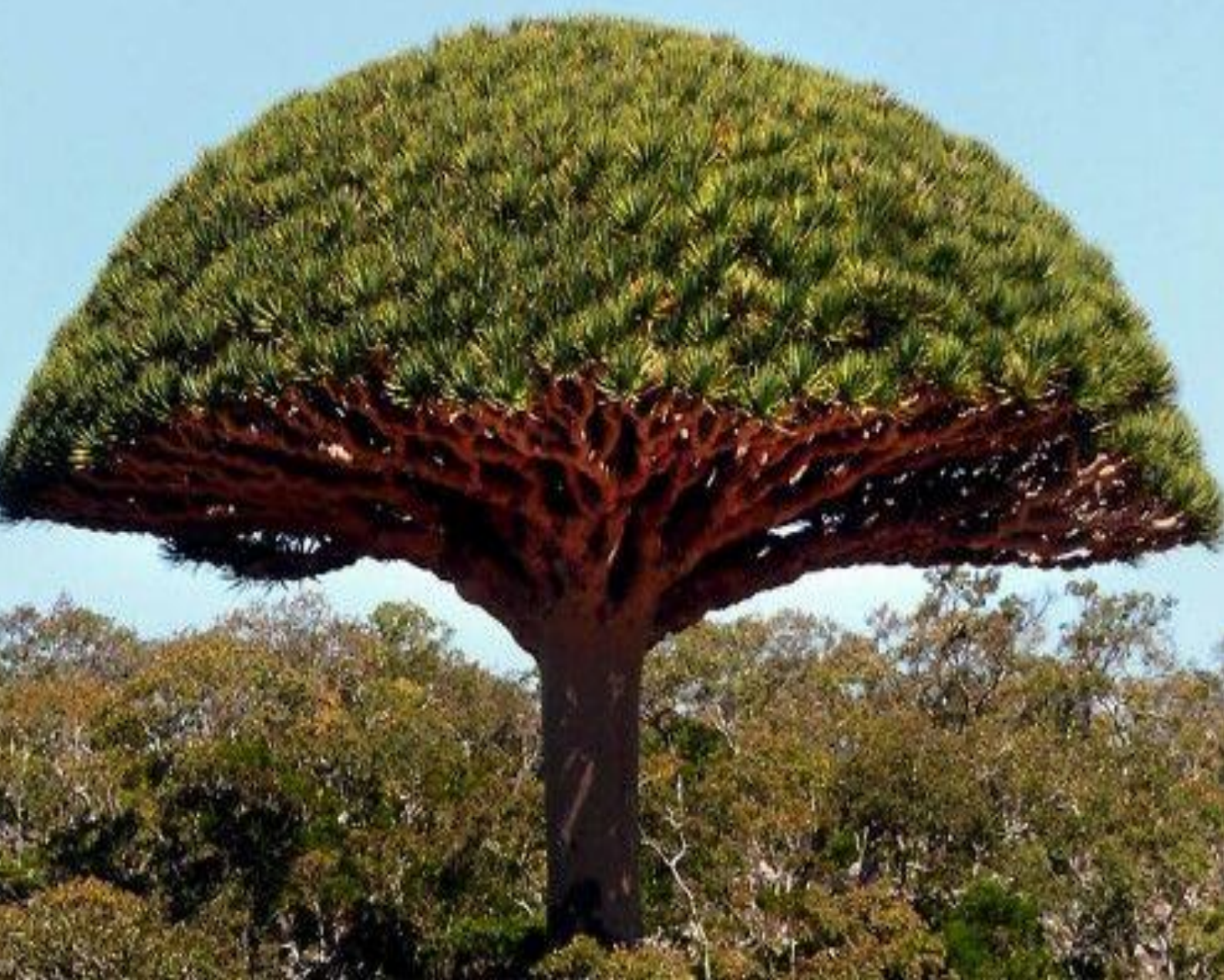


*Seiva Sangue de Dragão (Croton lechleri)
como Meio de Estocagem para Dentes
Avulsionados: Estudo in vitro da
Viabilidade Celular*

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Christine Men Martins



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

DEPARTAMENTO DE CLÍNICA INTEGRADA

CHRISTINE MEN MARTINS

***SEIVA SANGUE DE DRAGÃO (CROTON LECHLERI)
COMO MEIO DE ESTOCAGEM DE DENTES
AVULSIONADOS: ESTUDO IN VITRO DA VIABILIDADE
CELULAR***

ARAÇATUBA

2013

CHRISTINE MEN MARTINS

**SEIVA SANGUE DE DRAGÃO (*Croton lechleri*) COMO MEIO DE
ESTOCAGEM DE DENTES AVULSIONADOS: ESTUDO *IN VITRO* DA
VIABILIDADE CELULAR**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do
Câmpus de Araçatuba – Unesp, para a obtenção do Grau
de “Mestre em Odontologia” – Área de Concentração em
Clínica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Roberto Poi

Coorientadora: Profa. Dra. Mirian Marubayashi Hidalgo

ARAÇATUBA

2013

Catálogo-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

M386s Martins, Christine Men.
Sangue de dragão (Croton lechleri) como meio de
estocagem de dentes avulsionados : estudo in vitro da
viabilidade celular / Christine Men Martins. – Araçatuba :
[s.n.], 2013
53 f. : il. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientador: Prof. Dr. Wilson Roberto Poi

Coorientador: Profa. Dra. Mirian Marubayashi Hidalgo

1. Croton 2. Avulsão dentária 3. Sobrevivência celular
4. Reimplante dentário

Black D2
CDD 617.6

Dedico esse trabalho à minha família, representada pelos meus pais, Amilton e Elizabeth, e meus irmãos, Henrique e Heitor, por serem sempre meu porto seguro, minha fonte de amor e os maiores incentivadores em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

"Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que fez tua rosa tão importante."

Antoine de Saint-Exupéry

Agradeço primeiramente e acima de tudo a Deus, pois sem Ele nada disso estaria acontecendo. Ele me proporcionou sabedoria, persistência, dedicação, calma, estímulo e paciência para chegar até aqui. Agradeço à Santa Rita de Cássia, minha santa de devoção que me ampara em todos os momentos da minha vida!

Agradeço à minha família pai Amilton, mãe Elizabeth e irmãos Heitor e Henrique, pelo amor incondicional, apoio e por ser minha maior fonte de alegrias, força, esperança, amizade e cumplicidade. Estendo à gratidão ao Michel, Matheus e Gabriel, mais que primos, meus “quase-irmãos”, ao meu afilhado Henrique e aos meus tios Ivo e Suely. Saibam que o maior estímulo na minha vida é saber que alguém confia e espera de mim grandes coisas, sonham, trabalham, torcem e comemoram comigo. Deixo registrado aqui o meu muito obrigada!

Agradeço ao meu orientador Poi, à minha co-orientadora Mirian e aos professores que tenho grande estima Sonia, Celso, João Eduardo, Ana Sell e Alfredo. Obrigada por permitirem utilizá-los como exemplo e inspiração. “O professor medíocre expõe, o bom professor explica, o professor superior demonstra e o grande professor inspira” (William Arthur Ward). Obrigada por serem os verdadeiros mestres!

Agradeço à Thayse, Luiz, Lays, Vanessa e Daniela pelo companheirismo, cumplicidade e responsabilidade no desenvolvimento dessa pesquisa. Estendo o agradecimento à Elizane pela dedicação, ajuda, ensinamentos e parceria. “Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso” (Charles Chaplin). Obrigada!

Agradeço aos técnicos do Laboratório de Imunologia Básica da Universidade Estadual de Maringá Édina, Fabiano, Helen, Marco, Neuza e Silvana pelo apoio, ajuda no desenvolvimento do trabalho, pela colaboração e acolhimento no laboratório. Agradeço também aos técnicos do Laboratório de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Dirce, Gilmar e Paulo pela paciência, pelos ensinamentos e amizade. “O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria, se aprende é com

a vida e com os humildes” (Cora Carolina). Obrigada por nos mostrarem a sabedoria do dia-a-dia de um laboratório!

Agradeço aos meus colegas da turma de mestrado: Aline, Andressa, Leonardo, Lígia, Marcelle, Mayara, Moriel, Murilo e Vivian. Obrigada pela companhia, pelo acolhimento, pelos ensinamentos, pela parceria e cumplicidade. Agradeço, em especial, à equipe da Clínica Integrada: Moriel, Weglis, Elizane, Eloá, Denise, Celso, Sonia, Poi, Daniella e José. Vocês me ensinaram o verdadeiro conceito de equipe e permitiram surgir um sentimento que transcende o profissional e passa para o sentimento. Fizemos amizade, viajamos, estudamos, aprendemos, crescemos, demos as mãos e ao final de contas só tem uma palavra que me vem à mente: família! Obrigada!

Agradeço à Emily, Janaína, Morgana, Juliana, Lidiane, Michelle, Gabriella, Guilherme, Everton, Fred Lucas, Alexander e Kelly por serem meu apoio, meus amigos e meus companheiros. Agradeço à Mariana, Núbia, Juliana, Thais, Bruna e Maria Fernanda por dividirem comigo os cinco anos de faculdade repletos de boas memórias. Agradeço à Carol, Marcela, Aline, Vitor, Ana Paula e Pedro por todos esses anos de amizade. Como já dizia William Shakespeare “Amigos são a família que nos permitiram escolher”, obrigada por estarem ao meu lado!

Agradeço aos professores Ana Sell, Sônia, Celso e Angelo por terem aceitado de prontidão serem banca dessa dissertação e ao professor Emílio pela ajuda na parte estatística.

Agradeço à Universidade Estadual de Maringá por ter cedido o espaço para a realização da parte experimental e à Faculdade de Odontologia de Araçatuba pelo auxílio durante esses dois anos.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

“Um dia uma criança chegou diante de um pensador e perguntou-lhe:

- Que tamanho tem o universo?

Acariciando a cabeça da criança, ele olhou para o infinito e respondeu:

- O universo tem o tamanho do seu mundo.

Perturbada, ela novamente indagou:

- Que tamanho tem o meu mundo?

O pensador respondeu:

- Tem o tamanho dos seus sonhos.

Se os seus sonhos são pequenos, sua visão será pequena, suas metas serão limitadas, seus alvos serão diminutos, sua estrada será estreita, sua capacidade de suportar as tormentas será frágil.”

Augusto Cury

Martins, CM. Seiva Sangue de Dragão (*Croton lechleri*) como meio de estocagem de dentes avulsionados: estudo *in vitro* da viabilidade celular [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2013.

RESUMO

O sucesso do reimplante dentário depende da condição apresentada pelo ligamento periodontal cementário pós-avulsão que pode variar dependendo, dentre outros fatores, do meio de estocagem no qual esses dentes foram mantidos. O Sangue de Dragão (*Croton lechleri*), por auxiliar na formação de novo colágeno e apresentar propriedades cicatrizante, anti-inflamatória, antimicrobiana, pode ser um meio promissor. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da seiva Sangue de Dragão como meio de estocagem para dentes avulsionados por meio da aferição da viabilidade funcional e metabólica celular. Foi testada a diluição a 10% da seiva Sangue de Dragão e como controle, sua diluente solução tampão salina-fosfato (PBS). O leite ultrapasteurizado integral foi utilizado como meio comparativo por ser tradicionalmente utilizado e indicado para esse fim. O controle positivo utilizado foi o DMEM e o controle negativo, a água destilada. Este estudo *in vitro* comparou a eficácia dos meios para a manutenção da viabilidade de dois tipos celulares: mononucleares de sangue periférico humano e do ligamento periodontal mantidas em cultura. A avaliação da viabilidade foi feita por meio dos testes de exclusão por Azul de Tripan e colorimétrica a base de tetrazolato (MTT), sendo determinada nos tempos 1, 3, 6, 10 e 24h de incubação. Os ensaios foram repetidos 4 vezes, em triplicata para o MTT. A seiva Sangue de Dragão apresentou bons resultados. Para a metodologia com o Azul de Tripan, a seiva Sangue de Dragão foi semelhante ao leite ($p>0,0001$), ambos com os melhores valores de viabilidade, e para o MTT apresentou resultados superiores a todos os meios, inclusive o leite ($p<0,0001$). Com base nos resultados apresentados, conclui-se que a seiva Sangue de Dragão foi tão eficaz quanto o Leite, meio tradicionalmente utilizado para estocagem de dentes avulsionados, apresentando bom desempenho ao manter a integridade da membrana dos diferentes tipos celulares e a viabilidade funcional das células do ligamento periodontal.

Palavras-chave: *Croton*. Avulsão dentária. Sobrevivência celular. Reimplante dentário

Martins, CM. Dragon's Blood sap (*Croton lechleri*) as storage medium for avulsed teeth: an in vitro study of cell viability [dissertation]. Araçatuba: UNESP – Univ Estadual Paulista; 2013.

ABSTRACT

The success of tooth replantation depends on the condition of the cemental periodontal ligament post-avulsion. Avulsed tooth storage medium is one of the factors that interferes in the vitality of the periodontal ligament. The Dragon's Blood sap helps in the formation of new collagen and has been shown healing properties, as well anti-inflammatory, antiviral, antimicrobial and antitumor properties, in which aroused interest in the use as storage medium for avulsed teeth. Thus, the aim of this study is to evaluate the effectiveness of Dragon's Blood sap as storage medium for avulsed teeth by measuring the functional and metabolic cell viability. It was tested 10% dilution of the sap, and as a control, the diluent phosphate-buffered saline (PBS). Milk was used as comparative because of that is the storage medium traditionally and indicated. The positive control used was DMEM cell culture medium and the water as negative control. This in vitro study compared the effectiveness of the means for maintaining the viability of both cell types: human peripheral blood mononuclear cells and periodontal ligament cells maintained in culture. The cell viability was analyzed by the trypan blue staining exclusion method and the tetrazolium-based colorimetric assay (MTT) and determined at 1, 3, 6, 10 and 24h of incubation. The tests were repeated 4 times, in triplicate for MTT. Dragon's Blood sap provided positive results. For the trypan blue staining exclusion method, the Dragon's Blood was similar to milk ($p > 0.0001$) over time, both with the best values of viability, and for the MTT assay it's presented better results than all means, including milk ($p < 0.0001$). Therefore, based on the results presented, it was concluded that Dragon's Blood sap was as effective as milk, traditionally storage medium used and/or indicated for avulsed teeth, showing good performance while maintaining the integrity of the membrane of different cell types and functional viability of periodontal ligament cells.

Keywords: *Croton*. Tooth avulsion. Cell survival. Tooth replantation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Porcentagem relativa das médias da viabilidade para os diferentes meios em que as células foram estocadas	20
Figura 2	Porcentagem relativa das médias da viabilidade das células incubadas nos diferentes meios ao longo do período experimental	22
Figura 3	Porcentagem relativa das médias da viabilidade das células incubadas nos diferentes tempos experimentais	24

LISTA DE ABREVIATURAS

µL	Microlitro
%	Porcentagem
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	American Type Culture Collection
CO ₂	Dióxido de Carbono
DMEM	Meio Modificado Dulbecco Eagle
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Etileno Diamino Tetracetato Dissódico
H	Hora
L	Litro
mg	Miligrama
Min	Minuto
mL	Mililitro
mOsm	Miliosmol
MTT	[3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo]
nm	Nanômetro
°C	Graus Celcius
PBMC	Células Mononucleares de Sangue Periférico Humano
PBS	Solução Tampão Salina-Fosfato
pH	Potencial Hidrogeniônico
PSA	Solução de Penicilina 10.000UI/mL, Estreptomicina 20mg/mL e Anfotericina B 2mg/L
RPM	Rotações por Minuto
SAS	Statistical Analysis System
SFB	Soro Fetal Bovino
UI	Unidade Internacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 PROPOSIÇÃO	15
3 MATERIAL E MÉTODO	15
3.1 Obtenção da seiva Sangue de Dragão	15
3.2 Obtenção das células utilizadas nos experimentos	15
3.3 Metodologia de exclusão pelo corante Azul de Tripan	16
3.4 Metodologia colorimétrica a base de tetrazolato [3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo]	17
3.5 Análise dos resultados	18
4 RESULTADO	18
4.1 Viabilidade celular para os diferentes meios que as células foram estocadas	18
4.2 Viabilidade celular para os diferentes meios que as células foram incubadas ao longo do período experimental	21
4.3 Viabilidade das células incubadas nos diferentes tempos experimentais	23
5 DISCUSSÃO	25
6 CONCLUSÃO	29
REFERENCIAS	30
ANEXOS	34

1 INTRODUÇÃO

A vida moderna expõe o mundo a um alto índice de violência e a frequentes acidentes de trânsito, maior participação das pessoas em atividades esportivas e amplo acesso e disponibilidade a equipamentos de lazer com potencial de risco (1). Assim sendo, os traumatismos dentários têm sido os responsáveis por uma grande porcentagem de atendimentos nos serviços de urgência odontológica e em ambientes hospitalares, tornando-se um problema crescente em saúde pública (1-6). Dentre todos os traumatismos na dentição permanente, a avulsão pode representar de 16% a 25% (1) e após a sua ocorrência, a imediata reposição do dente, ainda no local do acidente, é a conduta ideal para manutenção das células do ligamento periodontal (7-10), porém, na maioria das vezes, isso não é possível, recorrendo-se ao reimplante dentário tardio (11, 12). O prognóstico de sucesso do reimplante é dependente, dentre outros fatores, da integridade das células do ligamento periodontal, que está diretamente relacionada com o meio de estocagem do dente, o tempo extra-alveolar e a não manipulação da porção radicular (10, 12-17).

Alternativas aos meios de estocagem de dentes avulsionados tradicionalmente utilizados devem ser buscadas, em especial quando se considera a tendência mundial voltada para as substâncias naturais (18) e para o uso de plantas medicinais, em função de vantagens como diversidade, flexibilidade, acessibilidade, disponibilidade e ampla aceitação. Mais que isso, possui todo apoio da Organização Mundial de Saúde, que estimulou pesquisas utilizando-as afirmando que as plantas medicinais seriam a maior e melhor fonte de obtenção de fármacos para a humanidade (19). Dentro deste contexto, um meio de conservação alternativo, considerando as propriedades apresentadas que resguardam os princípios biológicos, pode ser o Sangue de Dragão (*Croton lechleri*) (20-22). Entretanto, pouco se sabe sobre sua capacidade de manter a viabilidade celular.

Estudos prévios demonstraram importantes propriedades químicas e farmacológicas (23-26) da seiva Sangue de Dragão como sua atividade anti-inflamatória (20, 27-30), cicatrizante (31), inibidora de células cancerígenas (21, 25, 28, 31-36), antimicótica, antiviral, antifúngica e antibacteriana (22, 33, 34, 37-39), antioxidante (36, 40, 41) e potencializador do efeito osteogênico, mineralização e formação óssea (42). A seiva ainda é utilizada como tratamento de desordens digestivas, febres, hemorragias, úlceras estomacais e feridas (43, 44), reparando as áreas comprometidas por meio do auxílio na formação de novo colágeno (33).

Em um estudo realizado em incisivos murinos simuladamente avulsionados e mantidos na seiva Sangue de Dragão por 60min, observou-se que este interferiu positivamente no prognóstico, promovendo reparo tecidual na região do ligamento periodontal decorridos 60 dias do reimplante (45).

A falta de pesquisas *in vitro* com a utilização da seiva Sangue de Dragão para a manutenção de dentes avulsionados e a possibilidade de obtenção de resultados favoráveis, haja vista suas propriedades descritas na literatura, despertaram o interesse no desenvolvimento deste estudo.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia da seiva Sangue de Dragão como meio de estocagem para dentes avulsionados por meio da aferição da viabilidade funcional e metabólica celular.

3 MATERIAL E MÉTODO

O projeto foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá – UEM, CAAE número 0230.0.093.000-11.

3.1 Meios de Estocagem

A seiva bruta Sangue de Dragão foi gentilmente cedida pela MA Soares Marin Farmácia de Manipulação, Porto Velho/RO, Brasil. A partir dessa seiva, foi realizada a diluição simples de 10% em solução tampão salina-fosfato (PBS) para a obtenção do meio teste Sangue de Dragão. O leite utilizado foi o longa vida ultrapasteurizado integral.

3.2 Obtenção das células utilizadas nos experimentos

3.2.1 Células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs)

Para obtenção das PBMCs, 15mL de sangue venoso de quatro doadores saudáveis foram obtidos assepticamente em tubos heparinizados com 2 gotas de ACD (anticoagulante com misturas aditivas). As células foram isoladas pelo método descrito por Böyum (1968) modificado (46). Os tubos foram centrifugados a 1500rpm durante 15min à temperatura ambiente, sendo a interface entre eritrócitos e plasma (papa de leucócitos) colhida, diluída em 6mL PBS estéril e depositada sobre 2mL de um gradiente descontínuo de Histopaque® (Sigma Chemical Co., Estados Unidos) com densidade 1.076. Após centrifugação a 2000rpm durante 20min a temperatura ambiente, o anel de leucócitos formado foi removido com pipeta *Pasteur* e transferido para outro tubo. Foi realizado, então, três vezes o processo de lavagem com 8mL de PBS, centrifugando por 10min a 1500rpm e desprezando o sobrenadante. O precipitado celular resultante foi ressuspensionado em PBS e a suspensão celular ajustada a uma concentração de 1×10^7 cel/mL.

3.2.2 Células do ligamento periodontal humano mantidas em cultura

As células do ligamento periodontal humano foram gentilmente cedidas pelo laboratório de Virologia Aplicada da Universidade Federal de Santa Catarina. As células foram descongeladas e mantidas em estufa (5% CO₂ / 95% umidade, 37°C), em garrafas de

cultura celular (TTP-Techno Plastic Products, Suíça) contendo o Meio Modificado Dulbecco Eagle (DMEM – Cultilab, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – Cultilab, Brasil) e 1% de uma associação de penicilina 10.000UI/mL, estreptomicina 20mg/mL e anfotericina B 2mg/L (PSA – Cultilab, Brasil). As trocas sucessivas do meio de cultura foram realizadas a cada 48 ou 72h. Após ocorrer a confluência celular foi realizada a tripsinização, ou seja, as células foram lavadas duas vezes com PBS estéril e, posteriormente, incubadas com solução 0,25% tripsina EDTA (Sigma Chemical Co., Estados Unidos) durante alguns minutos para desprendimento das células. Após neutralização com DMEM, o precipitado celular foi lavado, dissolvido em meio de cultura fresco e distribuído em alíquotas para as garrafas. Cada procedimento de tripsinização deu origem a uma nova passagem e durante todo período experimental, quando em confluência, as células foram replicadas de modo a se manterem em ótimas condições de viabilidade em cultura. Os experimentos de viabilidade das células do ligamento periodontal humano, mantidos em cultura que se encontram entre a décima e décima quarta passagens, foram realizados seguindo a metodologia proposta pela ATCC (2001) (47), com modificações. Após a tripsinização as células foram ressuspensas e a concentração celular ajustada de acordo com cada modelo experimental.

3.3 Metodologia de exclusão pelo corante Azul de Tripan

Os ensaios foram realizados com uma concentração celular de 1×10^6 células/mL num volume total de 500µL para cada meio testado. Para os ensaios com os dois tipos celulares, os meios testados foram a seiva Sangue de Dragão a 10% em PBS, o qual foi o controle do diluente. O leite ultrapasteurizado integral foi utilizado como teste comparativo. Foram utilizados como controle positivo, o DMEM e negativo, a água destilada. Os tubos foram incubados durante 24h à temperatura ambiente, sendo que nos tempos de 1, 3, 6, 10 e 24h foram coletadas amostras e analisadas. A viabilidade celular foi repetida quatro vezes para cada meio de estocagem. A viabilidade foi determinada por observação microscópica das células excluídas pela coloração por Azul de Tripan, corante vital derivado da toluidina. Uma alíquota de cada amostra a ser analisada foi colocada em câmara de Neubauer e acrescentado igual volume do corante. As células foram consideradas não viáveis quando estavam impregnadas pelo corante ou apresentaram degeneração em forma de balão. As leituras foram realizadas por três examinadores diferentes e os resultados foram expressos em porcentagem.

3.4 Metodologia colorimétrica a base de tetrazolato [3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo]

As células do ligamento periodontal em cultura foram ressuspensas e a concentração celular ajustada em 1×10^4 células/mL, diluídas em 200 μ L de DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% PSA e foram semeadas em placas de 96 poços (TPP Techno Plastic Products, Suíça). Após incubação em estufa 5% CO₂ e 95% de umidade a 37°C por 24h para adesão das células nas placas, o meio DMEM foi descartado e 200 μ L dos meios a serem analisados foram adicionados: seiva Sangue de Dragão a 10%, Leite Ultrapasteurizado Integral, DMEM (controle positivo), a água destilada (controle negativo) e o PBS (controle do diluente). Finalizados os tempos de incubação de 1, 3, 6, 10 e 24h os meios de estocagem foram removidos e foram adicionados 50 μ L de solução de MTT (5mg/mL, MTT-azul de Tiazol, Sigma Chemical Co., Estados Unidos) para cada 150 μ L de DMEM em cada poço. As placas de cultura foram incubadas em estufa por 3h. Em seguida, o meio de cultura com MTT foi removido e 150 μ L de dimetilsufóxido (DMSO – Merck, Brasil) foram adicionados para que os cristais de formazan formados fossem dissolvidos. A viabilidade celular foi determinada por colorimetria, por meio da leitura da absorbância do conteúdo dos poços das placas, realizada em uma leitora de microplacas (ASYS Expert Plus Microplate Reader, Biochrom, Reino Unido) sob o comprimento de ondas de 550nm. O teste foi realizado em triplicata, com quatro repetições por meio analisado.

3.5 Análise dos resultados

Os dados do percentual de células viáveis que foram obtidos pelo método de exclusão com azul de Tripán para as células mononucleares e células do ligamento periodontal em cultura foram coletados para os grupos de forma dependente ao longo do tempo. Para análise desses resultados, foram utilizados os Modelos Lineares de Efeitos Mistos com o procedimento PROC NL MIXED do software SAS versão 9.

Os resultados que foram obtidos pelo teste de viabilidade das células em cultura pela metodologia MTT foram submetidos à análise de variância ANOVA Factorial, por meio do software SAS 9.3.n.

O nível de significância estatística foi estabelecido em 0,0001 para todas as análises.

4 RESULTADO

4.1 Viabilidade celular para os diferentes meios em que as células foram estocadas

As médias das viabilidades das células mantidas nos diferentes meios, independente do tempo, estão dispostas na Figura 1. Em A, pode-se observar a análise mediante a metodologia de exclusão por Azul de Tripan, sendo A1 para as PBMCs e em A2, para as células do ligamento periodontal. O Sangue de Dragão apresentou uma média de viabilidade de aproximadamente 77%, resultado um pouco inferior ao leite com 87% ($p > 0,0001$), ambos independente do tipo celular. O controle da diluição PBS e o controle positivo DMEM induziram uma variação entre os tipos celulares, sendo que as PBMCs apresentaram uma viabilidade inferior (PBS: 59%; DMEM: 53%) que as células do ligamento (PBS: 75%; DMEM: 81%) em cultura, ainda que sem diferença estatisticamente significativa. A água apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) com relação aos demais meios para as células do ligamento. Em B, são apresentados os valores da densidade óptica que representam a viabilidade das células do ligamento periodontal analisadas pelo MTT. O Sangue de Dragão apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) perante todos os demais meios, apresentando uma média da densidade óptica de aproximadamente 1,6, enquanto a do leite foi 1,2 e o DMEM 0,8. Tanto o PBS quanto a água apresentaram valores muito baixos, com aproximadamente 0,3 e 0, respectivamente.

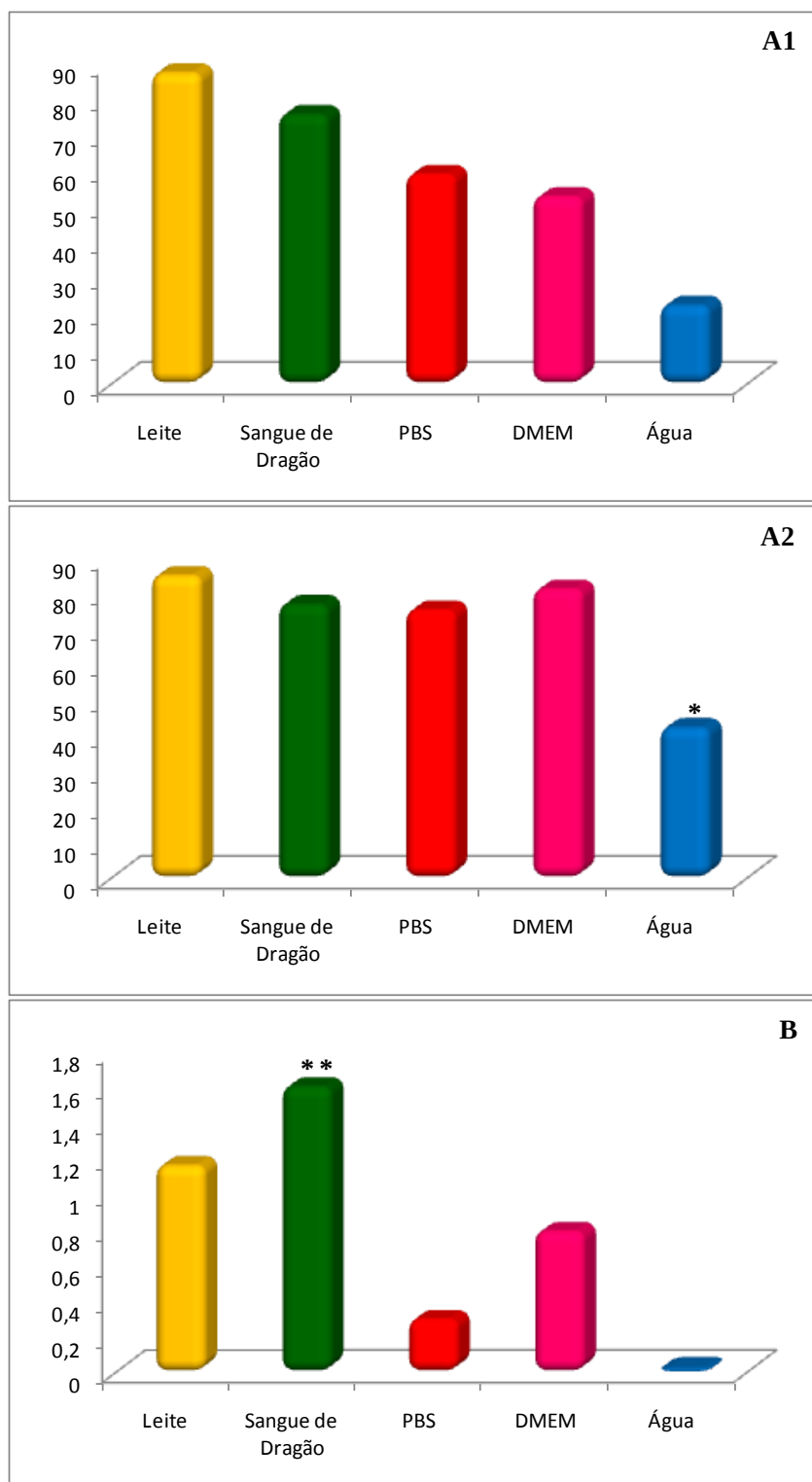


Fig. 1. Médias da viabilidade para os diferentes meios em que as células foram estocadas. A- Metodologia de exclusão pelo corante Azul de Tripán, sendo: **A1-** Células PBMC, **A2-** Células do Ligamento Periodontal em cultura; **B-** Metodologia MTT. *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) da água em relação aos demais meios; **Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) do Sangue de Dragão em relação aos demais meios. Ensaios repetidos 4x e em triplicata.

4.2 Viabilidade celular após incubações das células nos e ao longo do período experimental

A viabilidade das células mantidas nos meios testes e controles ao longo de um período de 24h está representada na Figura 2. Em A, pode-se observar a análise mediante a metodologia de exclusão por azul de tripan, sendo A1 para as PBMCs e A2, para as células do ligamento periodontal. Verifica-se que a seiva Sangue de Dragão remeteu a um desempenho homogêneo ao longo das 24h, com valores de viabilidade semelhantes ao controle da seiva, PBS, e ao controle positivo DMEM para as células do ligamento em cultura, porém, melhor para as PBMCs ($p > 0,0001$). O Leite apresentou desempenho superior, diferindo-se estatisticamente ($p < 0,0001$) de todos os demais meios de estocagem na 24ª hora, apenas para as células do ligamento periodontal. O controle negativo, água, diferiu-se estatisticamente ($p < 0,0001$) dos demais meios a partir da primeira hora. Em B, os valores da densidade óptica obtidos pelas células do ligamento periodontal analisadas pelo MTT demonstraram um desempenho funcional superior do Sangue de Dragão quando comparado aos demais meios, com valores crescentes ao longo do tempo. A seiva apresentou diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,0001$), sendo a partir da primeira hora com o PBS e a água, o DMEM a partir da sexta hora e o leite na 24ª hora.

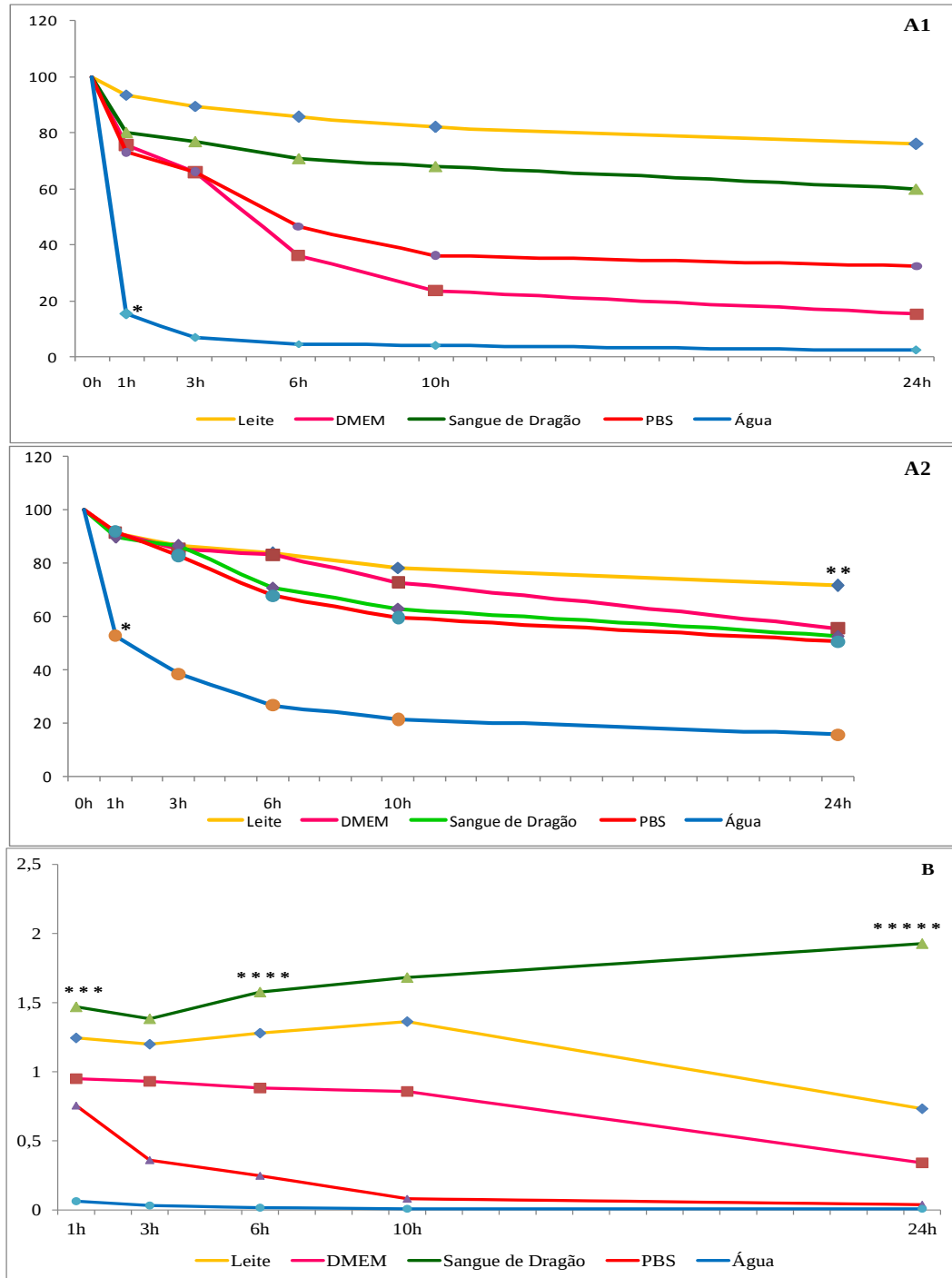


Fig. 2. Porcentagem relativa das médias da viabilidade das células incubadas nos diferentes meios ao longo do período experimental. A- Metodologia de exclusão pelo corante Azul de Tripán, sendo: A1- Células PBMC, A2- Células do Ligamento Periodontal em cultura; B- Metodologia MTT. *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) da água em relação aos demais meios a partir da primeira hora; **Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) do Leite em relação aos demais meios; *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) do Sangue de Dragão em relação ao PBS e água a partir da primeira hora; ****Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) do Sangue de Dragão em relação ao DMEM a partir da sexta hora; *****Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) do Sangue de Dragão em relação ao Leite. Ensaios repetidos 4x e em triplicata para o MTT.**

4.3) Viabilidade das células incubadas nos diferentes tempos experimentais

As análises das médias das porcentagens das viabilidades celulares nos diferentes tempos, independente dos meios estão descritas na Figura 3. Pela análise mediante a metodologia de exclusão por Azul de Tripan, em A1 se refere às PBMCs e em A2, às células do ligamento periodontal. Os resultados da metodologia por exclusão com Azul de Tripan mostraram que a viabilidade decresce ao longo do tempo, apresentando diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) entre todos os tempos. Quando analisadas pelo MTT, em B, a viabilidade das células do ligamento periodontal em cultura se mantém até a décima hora, havendo diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) em relação à 24ª hora.

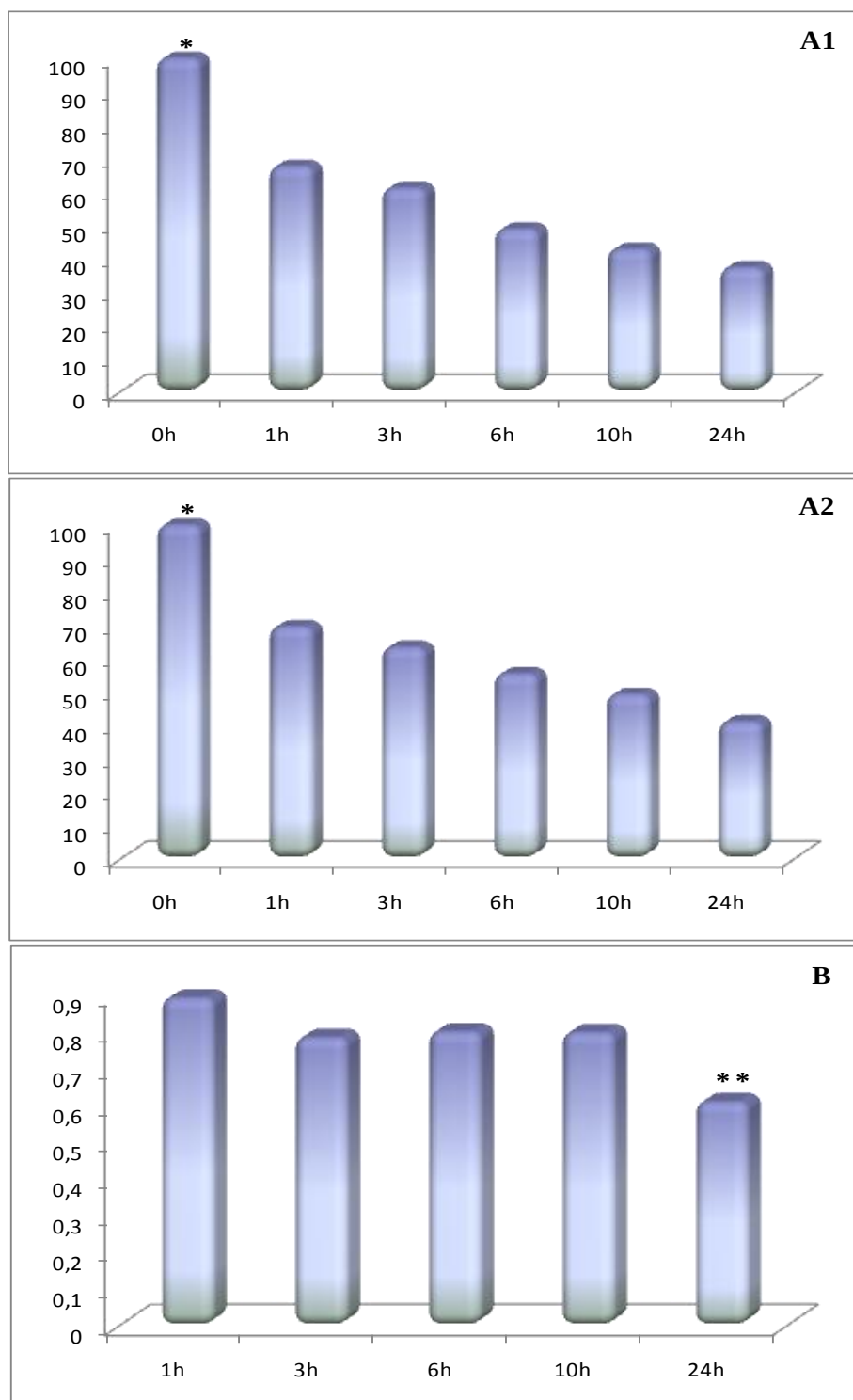


Fig. 3. Médias da viabilidade das células incubadas nos diferentes tempos experimentais. A- Metodologia de exclusão pelo corante Azul de Tripán, sendo: **A1-** Células PBMC, **A2-** Células do Ligamento Periodontal em cultura; **B-** Metodologia MTT. *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) entre todos os tempos; **Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) do tempo de 24 horas em relação aos demais tempos. Ensaios repetidos 4x e em triplicata para o MTT.

5 DISCUSSÃO

Após ter sido avulsionado, se faz necessário o reimplante dentário, que visa sua reinserção no alvéolo (9), e na maioria das vezes é feito tardiamente (11, 12). Para favorecer o prognóstico, medidas devem ser adotadas no sentido de preservar a integridade das células do ligamento periodontal (10, 13-17) utilizando um meio de estocagem do dente com propriedades químicas e farmacológicas que favoreçam o sucesso do reimplante (13, 14, 17, 48). Os efeitos anti-inflamatório, antimicrobiano e cicatrizante são de extrema relevância, e essas propriedades foram encontradas na seiva Sangue de Dragão em estudos prévios (22, 27-29, 33, 34, 37-39, 42, 49).

A escolha das PBMC como as células a serem testadas foi devido à facilidade e rapidez de sua obtenção e das células do ligamento periodontal em cultura foi para tentar aproximar a pesquisa *in vitro* com a realidade, já que são elas as células diretamente envolvidas no reimplante dentário pós-avulsão. O fato das PBMCs e dos fibroblastos em cultura permitirem a padronização da concentração celular, de modo a verificar eventuais variações, também foi considerado na escolha. Os diferentes tempos experimentais, simulando a variabilidade temporal dos possíveis reimplantes tardios, também foi uma aproximação com a realidade clínica.

A metodologia por coloração com Azul de Tripan, por ser comumente utilizada na avaliação da viabilidade, permite a análise da integridade física da membrana celular (46, 50), no entanto, não avalia a real capacidade metabólica da célula. A fim de superar essa lacuna, realizou-se a metodologia do MTT, cuja avaliação é feita por meio da quantificação da redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) em formazan (sal de coloração arroxeadado e insolúvel em água), que mede a atividade metabólica celular via enzimas oxiredutases dependentes de NADPH. Dessa forma, a redução do MTT a formazan será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade funcional das células (47).

Este trabalho é pioneiro acerca da verificação da viabilidade celular da seiva Sangue de Dragão, por meio de distintos ensaios com diferentes tipos celulares mantidos ao longo de 24 horas.

Os resultados mostraram que a seiva Sangue de Dragão apresentou boas propriedades na manutenção da viabilidade celular. Quando avaliado pela metodologia com o Azul de

Tripan, o Sangue de Dragão foi semelhante ao leite ($p>0,0001$), ambos com os melhores valores de viabilidade (Figura 1, A1 e A2), e a análise pelo MTT apresentou resultados superiores a todos os meios, inclusive ao leite ($p<0,0001$) (Figura 1, B). A seiva apresentou um desempenho homogêneo ao longo do tempo com valores semelhantes ao leite (Figura 2, A1 e A2) e o valor da densidade óptica aumentou ao longo do tempo para a análise do MTT (Figura 2, B).

A partir dos resultados obtidos, considerando os meios para incubação celular e sem considerar os tempos experimentais, observa-se que a seiva Sangue de Dragão apresentou bons resultados com os diferentes tipos celulares, assemelhando-se ao leite, comumente utilizado e indicado – inclusive pela Sociedade Brasileira de Traumatismo Dentário e Associação Internacional de Traumatismo Dentário – e ao DMEM ($p>0,0001$), na metodologia com Azul de Tripan e foi estatisticamente melhor que todos os demais meios testados pela metodologia do MTT. Isso significa que não só a membrana celular foi mantida íntegra, como a viabilidade funcional estava preservada. Também ao longo do tempo experimental, pela metodologia com Azul de Tripan, esse meio possibilitou a manutenção da viabilidade celular de forma homogênea, sem diferenças quando comparadas com o leite e com o controle positivo para ambos os tipos celulares, exceto para o ligamento periodontal em cultura às 24h.

Trabalhos realizados relatam que a seiva Sangue de Dragão apresenta compostos fenólicos, como o alcaloide tapsina, que atua no processo de reparo, favorece a quimiotaxia de fibroblastos e possui atividades anti-inflamatórias (24, 39, 49, 51, 52). Dessa forma, pode-se inferir que esse composto favoreceu a manutenção da viabilidade celular.

No ensaio MTT observado ao longo do tempo, a seiva Sangue de Dragão apresentou aumento da densidade óptica, que apresentou diferença estatisticamente significativa com todos os demais meios. Esse fato inusitado, que representa que houve uma proliferação celular ou um aumento metabólico das células, pode ser explicado baseando-se no trabalho realizado por Wang e colaboradores, em 2012 (42), no qual foi analisado o efeito do extrato etanólico do Sangue de Dragão sobre a diferenciação celular em osteoblastos e capacidade de mineralização e proliferação celular. Os resultados apresentaram real capacidade do extrato de influenciar na proliferação celular durante todo o tempo experimental de 25 dias. Outra hipótese seria a produção e/ou liberação de mediadores ou fatores de crescimento pelas próprias células após o contato com o Sangue de Dragão, pois nesse mesmo trabalho acima citado, a atividade celular foi aumentada durante 15 dias em decorrência da utilização do extrato. Esse achado deve ser melhor estudado.

Considerando a extração da seiva ser realizada de forma simples e natural, esta poderia apresentar contaminações microbianas que interfeririam negativamente no experimento. Não obstante, isso não ocorreu e a presença de proantocianidinas facilmente encontradas na seiva e na casca da árvore pode ser a explicação. Este composto químico possui ação antimicrobiana e, mesmo presente em pequena quantidade, possui um grande efeito (22, 33, 34, 37-39).

A análise microscópica foi dificultada, pois a seiva testada se assemelha ao sangue na cor e viscosidade, além de ser heterogêneo. Por isso, optou-se pela sua diluição. Diversos testes microscópicos com diluição seriada foram realizados e apenas a de 10% da seiva em PBS possibilitou uma leitura clara e segura.

O PBS é uma solução tampão salina-fosfato, que, análoga ao soro fisiológico, apresenta osmolaridade e pH ideais que se alia ao seu efeito tampão, porém, não apresenta íons essenciais e nem glicose que são indispensáveis às células (14, 53). Pela metodologia de exclusão por Azul de Tripan, observa-se que a viabilidade celular quando da presença do PBS foi semelhante à seiva Sangue de Dragão ao longo do período experimental, resultado diverso ao encontrado pelo MTT e justificado pela primeira metodologia apenas representar a integridade da membrana celular e não a sua real capacidade metabólica. Ou seja, em função da biocompatibilidade apresentada pelo PBS, as células mantiveram sua integridade física, contudo, estavam metabolicamente inviáveis. Outro ponto digno de menção é que o meio de estocagem seiva Sangue de Dragão continha, como já mencionado, 10% seiva em 90% PBS. Esses 10% de seiva foram suficientes para adequada viabilidade celular (Figura 1B, 2A1 e 2B).

Ainda sobre a concentração, Alves-Furlan, em 2010, realizou um trabalho que objetivava analisar o processo de reparo após o reimplante de dentes de rato, utilizando o Sangue de Dragão a 10 e 100% por 60 minutos e o resultado sugere que a seiva pura apresentou-se mais eficaz, podendo interferir positivamente no prognóstico do reimplante dentário. Com isso, pode-se inferir que a utilização da seiva mais concentrada poderia remeter a resultados ainda superiores, no entanto, a despeito das limitações do presente estudo, outras metodologias devem ser realizadas para confirmar essa hipótese.

O leite foi utilizado no experimento como teste comparativo, pois é o meio recomendado pela Sociedade Brasileira de Traumatologia Dentária e pela Associação Internacional de Traumatologia Dentária para estocagem de dentes avulsionados, por apresentar características peculiares para seu uso, como: conter pouco conteúdo bacteriano, ser um líquido isotônico, apresentar pH aproximadamente neutro e osmolalidade fisiológica,

conter fatores de crescimento e nutrientes essenciais para as células (12, 14, 15, 48). Dentre todos os meios atualmente estudados, ele é considerado um meio adequado e os presentes resultados mostraram que o leite conseguiu manter a viabilidade celular homogênea e em bons níveis em todos os experimentos.

Como controles utilizados, o positivo, DMEM, é uma solução desenvolvida para a finalidade de manter culturas celulares, minimizando os danos às células e proporcionando condições para a proliferação celular (54). Porém, nos experimentos, verificou-se um declínio acentuado da viabilidade celular nele mantida, o que pode ser explicado pelo fato de não permanecer nas suas condições ideais de uso, ou seja, em estufa com 5% de CO₂, 95% de umidade e 37°C. Optou-se por simular as condições de similaridade clínica, ou seja, mantidas em temperatura ambiente.

O controle negativo escolhido para o experimento foi a água por este apresentar características inadequadas para a manutenção de dentes avulsionados, possuindo contaminação microbiana, hipotonicidade e pH e osmolaridade fora da faixa fisiológica, que favorece a lise das células (54), resultado corroborado em todas as metodologias já a partir da primeira hora de incubação. Mas, em casos de avulsão, pode ser o único meio de estocagem disponível no momento e no local do traumatismo.

Analisados os tempos de incubação das células, a manutenção da integridade celular foi decrescendo ao longo do tempo, como esperado, e se mantiveram funcionalmente ativas até 10 horas, quando foram estatisticamente diferentes do tempo 24h. A seiva Sangue de Dragão permitiu a manutenção da viabilidade funcional das células ao longo das 24h. No entanto, estes dados de análise do tempo unicamente, devem ser considerados com reservas, uma vez que se sabe que o reimplante deve ser realizado o mais rápido possível (14, 50), pois a diminuição do tempo extraoral, associado à um bom meio de estocagem para dentes avulsionados e a não manipulação da porção radicular contribuirão para o prognóstico de sucesso de um reimplante de dente avulsionado (10, 13-17).

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que a seiva Sangue de Dragão foi eficaz como meio de estocagem de dentes avulsionados, apresentando bom desempenho ao manter a integridade da membrana dos diferentes tipos celulares e a viabilidade funcional das células do ligamento periodontal.

REFERENCIAS

1. Traebert J, Almeida ICS, Garghetti C, Marcenes W. Prevalência, necessidade de tratamento e fatores predisponentes do traumatismo na dentição permanente de escolares de 11 a 13 anos de idade. *Cad Saúde Pública* 2004;20(2):403-410.
2. Bastone EB, Freer TJ, McNamara JR. Epidemiology of dental trauma: a review of literature. *Australian Dental Journal* 2000;45(1):2-9.
3. Caldas Jr AF, Burgos MEA. A retrospective study of traumatic dental injuries in a Brazilian dental trauma clinic. *Dental traumatology* 2001; 17: 250-253.
4. Cohenca N, Roges RA, Roges R. The incidence and severity of dental trauma in intercollegiate athletes. *J Am Dent Assoc.* 2007;138(8):1121-6.
5. Marcenes W, Beiruti, N, Tayfour D, Issa S. Epidemiology of traumatic injuries to the permanent incisors of 9-12-year-old schoolchildren in Damascus, Syria. *Endod Dent Traumatol.* 1999; 15(6):117-123.
6. Prata THC, Duarte M SR, Miquilinto JL, Valera MC, Araújo, MAM. Etiologia e frequência das injúrias dentárias traumáticas em pacientes do Centro de Traumatismos Dentários da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. *Rev Odonol. UNESP* 2000;29(1/2):43-53.
7. 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.
8. Castilho LR, Sundfeld ML, de Andrade DF, Panzarini SR, Poi WR. Evaluation of sixth grade primary schoolchildren's knowledge about avulsion and dental reimplantation. *Dent Traumatol*, 2009; 25(4):429-432.
9. Cohen S, Hargreaves KM. *Caminhos da polpa*. 9 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2007. 1104p.
10. Flores MT, Anderson L, Andreasen JO, Bakland LK, Malmgren B, Barnett F, Bourguignon C, Diangelis A, Hicks L, Sigurdsson A, Trope M, Tsukiboshi M, Von Arx T. Guidelines for the management of traumatic dental injuries. II. Avulsion of permanent teeth. *Dental traumatol* 2007, 23:130-136.
11. Barret EJ, Kenny DJ. Avulsed permanent teeth: a review of the literature and treatment guidelines. *Endod Dent Traumatol* 1997, 13: 153-163.
12. 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(1):111-119.
13. Anderson L, Al-Asfour A, Al-Jame Q. Knowledge of first-aid measures of avulsion and replantation of teeth: an interview of 221 Kuwaiti schoolchildren. *Dental Traumatology* 2006, 22: 57-65.
14. Marino T, West LA, Liewehr FR, Mailhot JM, Buxton TB, Runner RR, McPherson JC. Determination of periodontal ligament cell viability in long shelf-life milk. *J Endodo* 2000, 26:699-702.

15. Mori GG, Nunes DC, Castilho LR, de Moraes IG, Poi WR. Propolis as storage media for avulsed teeth: microscopic and morphometric analysis in rats. *Dental Traumatol*, 2010; 26(1):80-85.
16. Panzarini SR, Gulinelli JL, Poi WR, Sonoda CK, Pedrini D, Brandini DA. Treatment of root surface in delayed tooth replantation: a review of literature. *Dent Traumatol*, 2008;24:277-82.
17. Raphael SL, Gregory PJ. Parenteral awareness of the emergency management of avulsed teeth in children. *Aust Dent J*, 1990, 35: 130-133.
18. Li JWH, Vederas JC. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science* 2009;325:161-165.
19. World Health Organization. WHO Traditional Medicine Strategy 2002–2005. Geneva: WHO; 2002.
20. Itokawa H, Ichiara Y, Mochizuka M, Enomori T, Morita H, Shiota D, Inamatsu M, Take YK. A cytotoxic substance from sabgre de grado. *Chem Pharm Bull* 1991, 39:1041-1042.
21. Rossi D, Bruni R, Bianchi N, Chiarabelli C, Gambari R, Medici A, Lista A, Paga Netto G. Evaluation of the mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potencial of *Croton lechleri* (Muell Arg), latex. *Phytomedicine* 2003, 10:139-144.
22. Ubillas R, Jolad SD, Bruening RC, Kernan MR, King SR, Sesin DF, Barret M, Stoddart CA, Flaster T, Kuo J, Ayala F, Meza E, Castanel M, Mrmeekin D, Rozhon E, Tempesta MS, Barnard D, Huffman J, Smee D, Sidwell R, Soike K, Brazier A, Safrin S, Orlando R, Kenny PT, Berova N, Nakanishi K. SP-303 an antiviral oligomeric proanthocyanidin from the latex of *Croton lechleri* (Sangre de Dragão). *Phytomedicine* 1994, 1:77-106.
23. Cai Y, Evans F, Roberts M, Phillipson JD, Zenk M, Gleba Y. Polyphenolic compounds from *Croton lechleri*. *Phytochemistry* 1991;30:2033-40.
24. Gupta D, Bleakley B, Gupta RK. Dragon's blood: botany, chemistry and therapeutic uses. *J Ethnopharmacol*. 2008;115:361– 380.
25. Lopes ML, Saffi J, Echeverrigaray S, Henrique JAP, Salvador M. Mutagenic and oxidant activities of *Croton lechleri* SAP in biological systems. *J Ethnopharmacol* 2004, 95:437-445.
26. Milanowski DJ, Winter RE, Elvin-Lewis MP, Lewis WH. Geographic distribution of three alkaloid chemotypes of *Croton lechleri*. *J Nat Prod*. 2002; 65: 814-819.
27. Li YS, Wang JX, Jia MM, Liu M, Li XJ, Tang HB. Dragon's blood inhibits chronic inflammatory and neuropathic pain responds by blocking the synthesis and release of substance P in rats. *J Pharmacol Sci* 2012; 118:43 – 54.
28. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological Rev* 2000, 52: 673-751.
29. Pereira U, Gal CGL, Gal GL, Boulais N, Lebonvallet N, Dorange G, Lefeuvre L, Gougerot A, Misery L. Effects of sangre de drago in an in vitro model of cutaneous neurogenic inflammation. *Exp Dermatol*, 2010; 19:796-799.
30. Pieters L, De Bruyne T, Claeys M, Vlietinck A, Calomme M, Janden Berghe D. Isolation of a dihydrobenzofuran lignin from South American dragon's blood (*Croton* sp.) as an inhibitor of cell proliferation. *J Na Prod* 1993, 56:889-906.

31. Guevara AQ, Villacorta OG. Efecto de la intensidad de luz, método de conservación y tiempo de almacenamiento em La germinación de *Croton lechleri* Muell Arg. *Folia Amazônica* 1998, 9:45-62.
32. Alonso-Castro AJ; Ortiz-Sánchez E, Dóminguez F, López-Toledo G, Chávez M, Ortiz-Tello AJ, García-Carrancá A. Antitumor effect of *Croton lechleri* Mull. Arg. (Euphorbiaceae). *J Etnopharmacol.* 2012; 140: 438-442.
33. Chen ZP, Cai Y, Phlillipson JP. Studies on the anti-tumor, anti-bacterial, and wound-healing properties of dragon`s blood. *Planta Med* 1994, 60:541-545.
34. Cui JL, Guo SX, Dong H, Xiao P. Endophytic fungi from Dragon`s blood specimens: isolation, identification, phylogenetic diversity and bioactivity. *Phytoter. Res.* 2011; 25: 1189-1195.
35. Montopoli M, Bertin R, Chen Z, Bolcato J, Caparrotta L, Frolidi G. *Croton lechleri* sap and isolated alkaloid taspine exhibit inhibition against human melanoma SK23 and colon cancer HT29 celllines. *J Etnopharmacol.* 2012; 144:747-753.
36. O'Brien P. Antioxidants and cancer: molecular mechanisms. In:Armstrong, D. (Ed.). *Free radicals in diagnostic medicine.* New York: Plenum Press, 1994; 215-38.
37. Gupta D, Gupta RK. Bioprotective properties of Dragon`s blood resin: in vitro evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity. *BMC Complement Altern Med* 2011, 11:13.
38. Luo Y, Wang H, Zhao YX, Zeng YB, Shen HY, Dai HF, Mei WL. Cytotoxic and antibacterial flavonoids from Dragon`s blood of *Dracaena cambodiana*. *Planta Med.* 2011; 77:2053-2056.
39. Williams, J.E. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the Peruvian rainforest with a particular emphasis on *Una de Gato* and *Sangre de Grado*. *Altern Med Rev.* 2001;6:567-579.
40. Gonzales GF, Valerio LG. Medicinal plants from Peru: a review of plants as potential agents against cancer. *Anticancer Agents Med Chem* 2006, 6:429-444.
41. Jones K. Review of *sangre de drago* (*Croton lechleri*) a South American tree sap in the treatment of diarrhea, inflammation, insect bites, viral infections, and wounds: traditional uses to clinical research. *J Altern Complement Med* 2003, 9:877-896.
42. Wang W, Olson D, Cheng B, Guo X, Wang K. *Sanguis Draconis* resin stimulates osteoblast alkaline phosphatase activity and mineralization in MC3T3-E1 cells. *J Etnopharmacol.* 2012; 142: 168-174.
43. Mark M, Naughton W, Zhang XJ, Thompsom J, Charbonet R, Bobrowski P, Lao J, Trentacosti A, Sandoval M. Treatment of gastric ulcers and diarrhea with the Amazonian herbal medicine *sangre de grado*. *Am J Physiol Gastrointes T Liver Physiol* 2000;279:G192-200.
44. Sandoval M, Okuhama NN, Clark M, Angeles FM, Lao J, Bustamante S, Miller MJ. *Sangre de grado* *Croton palanostigma* induces apoptosis in human gastrointestinal câncer cells. *J Ethnopharmacol* 2002; 80:121-9.
45. Furlan LCA. Análise do processo de reparo do reimplante dentário utilizando a seiva do *Croton lechleri* (sangue de dragão), a 10% e 100%, como meio de conservação. Tese [doutorado] - Araçatuba: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, 2010.

46. Boyum A. Isolation of mononuclear and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968, 97:77-89.
47. American Type Culture Collection. MTT cell proliferation assay instructions. Catalog, number 30 – 1010k, 2001.
48. Courts FJ, Mueller WA, Tabeling HJ. Milk as an interim storage medium for avulsed teeth. *Pediatr Dent* 1983, 5:183-186.
49. Vaisberg A, Milla M, Planas M, Cordova J, de Agusti E, Ferreyara R, Mustinga MC, Carlin L, Hammo ND. Taspine is the cicatrizant in Sangre de Grado extracted from *Croton lechleri*. *Planta Med* 1989;55:140-3.
50. Blömlöf L, Otteskog P. Viability of human periodontal ligament cells after storage in milk or saliva. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 1980; 88:436-440.
51. Risco E, Ghia F, Vila R, Iglesias J, Alvarez E, Canigüeral S. Immunomodulatory activity and chemical characterisation of sangue de drago (dragon.s blood) from *Croton lechleri*. *Planta Med*.2003;69:785-794.
52. Zhang, J, Zhang, Y, Zhang, S. Sicen Wang, Langchong He Discovery of novel taspine derivatives as antiangiogenic agents *Bioorg Med Chem Lett* 2010; 20:718–721.
53. Martin MP, Pileggi, RA. A quantitative analysis of Propolis: a promising new storage media following avulsion. *Dent Traumatol*, 2004; 20:85-89.
54. Casaroto AR, Hidalgo MM, Sell AM, Franco SL, Cuman RKN, Moreschi E, Victorino FR, Steffens VA, Bersani-Amado CA. Study of the effectiveness of propolis extract as a storage medium for avulsed teeth. *Dental Traumatology*, 26: 323–331, 2010.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ PERMANENTE DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS



Fundação Universidade Estadual de Maringá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos

CAAE Nº. 0230.0.093.000-11

PARECER Nº. 458/2011

Pesquisador(a) Responsável: Mirian Marubnyashi Hidalgo

Centro/Departamento: CCS / Departamento de Odontologia

Título do projeto: Sangue de Dragão (*Croton lechleri*) como meio de estocagem de dentes avulsionados: estudo in vitro da viabilidade celular

Considerações:

Trata-se de projeto de pesquisa com o objetivo de comparar a eficácia do Sangue de Dragão com outros meios de estocagem de três tipos celulares (células mononucleares de sangue periférico humano; células do ligamento periodontal provenientes de dentes avulsionados e células mantidas em cultura celular), tradicionalmente utilizados e/ou indicados. A seiva de Dragão é uma seiva da árvore *Croton lechleri*.

Em sua submissão inicial a este comitê de ética em pesquisa, o protocolo restou pendente conforme parecer 306/2011-COPEP, datado de 01 de julho de 2011.

Abaixo são relacionados os itens que levaram à pendência do projeto, seguidos das respostas e esclarecimentos do pesquisador, e pela análise desta relatoria, no que tange à adequação ética das alterações implementadas:

Pendência 1: Apresentar Documento de Cessão da seiva de Sangue de Dragão pela MA Soares Marin Farmácia de Manipulação, ou esclarecer se o material será adquirido com recursos próprios do projeto (neste caso, incluir custos no orçamento apresentado);

Resposta do pesquisador: A pesquisadora esclarece que a seiva de sangue de dragão será cedida pela referida Farmácia de manipulação mediante aquisição com recursos próprios e incluído no orçamento anexo e destacado em vermelho no valor de R\$ 100,00.

Parecer do relator: Face ao exposto e considerando os esclarecimentos e adequações implementadas, considera-se a pendência atendida.

Pendência 2: Apresentar autorização do coordenador do Laboratório de Imunogenética, assinada pelo Coordenador ou vice (se este configurar parte interessada na pesquisa/participante), referenciando o protocolo supra-identificado.

Resposta do pesquisador: Foi anexada nova autorização, explicitando o número do protocolo da pesquisa e assinada pelo Prof. Rafael Campos Bezerra.

Parecer do relator: Face ao exposto e considerando os esclarecimentos e adequações implementadas, considera-se a pendência atendida.

Pendência 3: Revisar TCLE, reformulando a declaração de isenção de riscos (que contraria a norma ética vigente), e informando em seu lugar que "não estão previstos riscos inaceitáveis na participação no estudo".

Resposta do pesquisador: Os TCLEs foram revisados de acordo com as instruções apresentadas, com cópia anexo.

Parecer do relator: Face ao exposto e considerando os esclarecimentos e adequações implementadas, considera-se a pendência atendida.



CAAE 0230-11... /



Fundação Universidade Estadual de Maringá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos

1...CAAE 0230-11

Pendência 4: Solicita-se apresentação de documento de concessão do material em questão, assinado pelo Coordenador do Laboratório de Virologia Aplicada da Universidade Federal de Santa Catarina, acompanhado de esclarecimentos quanto aos aspectos éticos deste armazenamento (especificar se as referidas culturas de células compõem banco de material biológico institucional com regulamento próprio, ou se são provenientes de outros estudos anteriores, bem como apresentação do TCLE por meio do qual tal material foi coletado e armazenado).

Resposta do pesquisador: As células foram gentilmente cedidas por ocasião de outra pesquisa, já finalizada, cujo parecer favorável deste Comitê ao Relatório Final se encontra anexo (CAAE 0158-08, edital n. 004/2010-COPEP). As células não utilizadas foram devidamente congeladas, acondicionadas e serão objeto desta pesquisa.

Parecer do relator: Não obstante a aprovação anterior de protocolo envolvendo material biológico armazenado, qualquer novo uso de amostras previamente coletadas deve estar salvaguardada por meio de TCLE, especificando a opção do sujeito doador em permitir o uso de seus dados/materiais biológicos em pesquisas futuras. Considerando, no entanto, a regulamentação recente (Res. 441/01 - CNS, de 12 de maio de 2011), relativamente ao processo de organização de bancos e repositórios de material biológico para fins de pesquisa, solicitamos a regularização dos bancos atualmente existentes, sob responsabilidade de vosso grupo de pesquisa, no sentido de se adequarem à norma ética vigente. Por fim, esta relatoria é de parecer favorável à aprovação da presente pesquisa, recomendando no entanto, que nenhum dado que permita identificar o sujeito doador da amostra seja divulgado, de modo a resguardar os compromissos de sigilo e confidencialidade das informações.

Pendência 5: Incluir informações no desenho do estudo, no que se refere ao procedimento de recrutamento e abordagem dos sujeitos sadios do qual se obterão as amostras sanguíneas a serem utilizadas nas avaliações de viabilidade celular, estabelecendo critérios para que tal voluntário não configure situação de vulnerabilidade, garantindo o caráter voluntário da participação (sugere-se evitar o recrutamento de discentes ou sujeitos em relação de dependência hierárquica com os pesquisadores).

Resposta do pesquisador: Foram incluídas informações no desenho do estudo, conforme solicitado e atendendo as sugestões apresentadas.

Parecer do relator: Face ao exposto e considerando os esclarecimentos e adequações implementadas, considera-se a pendência atendida.

Considerando o processo de apreciação ética do protocolo, à luz das normativas éticas vigentes, e tendo em vista o atendimento das pendências previamente levantadas, este comitê de ética em pesquisa se manifesta pela aprovação do protocolo, na forma em que ora se apresenta.

Com relação à aplicação do TCLE, conforme instrução operacional do sistema CEP/CONEP, datada de 21/03/2011, os pesquisadores deverão fazer constar, além das assinaturas de ambos (pesquisador e sujeito de pesquisa) nos campos específicos da última página, a rubrica, também de ambos, em todas as folhas do documento (TCLE).

SITUAÇÃO: APROVADO

CONEP: (X) para registro () para análise e parecer Data: 02/09/2011

Relatório Final para Comitê: () Não (X) Sim Data: Janeiro de 2013

O protocolo foi apreciado de acordo com a Resolução nº. 196/96 e complementares do CNS/MS, na 223ª reunião do COPEP em 2/9/2011.

Profa. Dra. Ieda Harumi Higashihashi
 Presidente do COPEP

ANEXO B – Normas do periódico “Dental Traumatology”

Dental Traumatology

Official Publication of the International Association for Dental Traumatology and the International Academy of Sports Dentistry

Edited by:

Lars Andersson

Print ISSN: 1600-4469

Online ISSN: 1600-9657

Frequency: Bi-monthly

Current Volume: 28 / 2012

ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2010: Dentistry, Oral Surgery & Medicine: 44 / 74

Impact Factor: 1.268

Author Guidelines

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

Relevant Documents: Copyright Transfer Agreement

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 Blackwell Publishing 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.

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 Assignment

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 sent before any manuscript can be published. Authors must send the completed Copyright Transfer Agreement upon receiving notice of manuscript acceptance, i.e., do not send the Copyright Transfer Agreement at submission. Please return your completed form to:

Angelo Morales

Production Editor

Wiley Services Singapore Pte Ltd

1 Fusionopolis Walk, #07-01 Solaris South Tower,
Singapore 138628

Alternatively a scanned version of the form can be emailed to amorales@wiley.com or faxed to ++65 6643 8599. For questions concerning copyright, please visit [Wiley-Blackwell's Copyright FAQ](#)

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.

For the full list of terms and conditions, see

http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms.

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.

For questions concerning copyright, please visit [Wiley-Blackwell's Copyright FAQ](#)

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 dtoffice@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 (.rtf) 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.

Please note that any manuscripts uploaded as Word 2007 (.docx) will be automatically rejected. Please save any .docx file as .doc before uploading.

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 dtoffice@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-ExcerptaMedica; 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

Try to avoid using abstracts of articles as references. 'Unpublished observations', 'personal communications', and 'unaccepted papers' may not be used as references, although references to written, not verbal, communications may be inserted (in parentheses) in the text. Examples of correct forms of references are given below.

Journals: Standard journal article - list all authors when six or fewer; when seven or more, list first six authors and add et al. Examples:

Andreasen JO, Hjørting-Hansen E. Replantation of teeth. I. Radiographic and clinical study of 100 human teeth. *Acta Odontol Scand* 1966;24:263-86.

Corporate author: American Association of Endodontists. Recommended guidelines for treatment of the avulsed tooth. *J Endod* 1983;9:571.

Books and other monographs:

Examples:

Personal author(s) Grossman LI. Endodontic practice. 10th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1981. p. 176-9.

Chapter in book:

Sanders B, Brady FA, Johnson R. Injuries. In: Sanders B, editor. Pediatric oral and maxillofacial surgery. St. Louis: Mosby; 1979. p. 330-400.

5.4. Tables, Figures and Figure Legends

Tables should only be used to clarify important points. Tables must, as far as possible, be self-explanatory. The tables should be numbered consecutively with Arabic numerals.

Figures: All graphs, drawings and photographs are considered figures and should be numbered in sequence with Arabic numerals and abbreviated Fig(s). Each figure should have a legend and all legends should be numbered correspondingly and included at the end of the manuscript. Text on the figures should be in capitals. Figures should be planned to fit the proportions of the printed page.

All figures and artwork must be provided in electronic format. Please save vector graphics (e.g. line artwork) in Encapsulated Postscript Format (EPS) and bitmap files (e.g. half-tones) or clinical or in vitro pictures in Tagged Image Format (TIFF). JPEG files are also acceptable. Detailed information on our digital illustration standards can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

Unnecessary figures and parts (panels) of figures should be avoided: data presented in small tables or histograms, for instance, can generally be stated briefly in the text instead. Figures should not contain more than one panel unless the parts are logically connected

Figures divided into parts should be labelled with a lower-case, boldface, roman letter, a, b, and so on, in the same type size as used elsewhere in the figure. Lettering in figures should be in lower-case type, with the first letter capitalized. Units should have a single space between the number and unit, and follow SI nomenclature common to a particular field. Unusual units and abbreviations should be spelled out in full or defined in the legend. Scale bars should be used rather than magnification factors, with the length of the bar defined in the legend rather than on the bar itself. In general visual cues (on the figures themselves) are preferred to verbal explanations in the legend (e.g. broken line, open red triangles etc)

Preparation of Electronic Figures for Publication: Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the

final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Further information can be obtained at Blackwell Publishing's guidelines for figures:

<http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

Check your electronic artwork before submitting it:

<http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>

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.

Figure Legends should be a separate section of the manuscript, and should begin with a brief title for the whole figure and continue with a short description of each panel and the symbols used: they should not contain any details of methods

5.5. Supporting Material Publication in electronic formats has created opportunities for adding details or whole sections in the electronic version only. Authors need to work closely with the editors in developing or using such new publication formats.

Supporting Material, such as data sets or additional figures or tables, that will not be published in the print edition of the journal, but which will be viewable via the online edition, can be submitted.

It should be clearly stated at the time of submission that the Supporting Material is intended to be made available through the online edition. If the size or format of the Supporting Material is such that it cannot be accommodated on the journal's Web site, the author agrees to make the Supporting Material available free of charge on a permanent Web site, to which links will be set up from the journal's website. The author must advise Blackwell Publishing if the URL of the website where the Supporting Material is located changes. The content of the Supporting Material must not be altered after the paper has been accepted for publication.

The availability of Supporting Material should be indicated in the main manuscript by a paragraph, to appear after the References, headed 'Supporting Material' and providing titles of figures, tables, etc. In order to protect reviewer anonymity, material posted on the authors Web site cannot be reviewed. The Supporting Material is an integral part of the article and will be reviewed accordingly.

Extra issues - Larger papers or monographs may be published as additional issues (numbered as the ordinary issues), the full cost being paid by the author. Further information may be obtained from the editor.

6. AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.

6.1 Proof Corrections

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following web site: www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html. This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof.

6.2 Early View (Publication Prior to Print) *Dental Traumatology* is covered by Blackwell Publishing's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

6.3 Author Services Online production tracking is available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article - once it

has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.\

For more substantial information on the services provided for authors, please see Wiley-Blackwell Author Services

6.4 Author Material Archive Policy Please note that unless specifically requested, Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible.

6.5 Offprints and Extra Copies A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Additional paper offprints may be ordered online. Please click on the following link, fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required fields: Offprint Cosprinters. If you have queries about offprints please email offprint@cosprinters.com

6.6 Note to NIH Grantees Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate