



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
Campus de São José dos Campos  
Instituto de Ciência e Tecnologia

**FELIPE DE SOUZA MATOS**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIRREABSORTIVO DE GÉIS DE  
FENTOLAMINA E PROPRANOLOL EM REIMPLANTES DENTÁRIOS**

2019

**FELIPE DE SOUZA MATOS**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIRREABSORTIVO DE GÉIS DE FENTOLAMINA  
E PROPANOLOL EM REIMPLANTES DENTÁRIOS**

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA.

Área: Endodontia. Linha de pesquisa: Traumatismo dental.

Orientador: Prof. Adj. Cláudio Antonio Talge Carvalho

Coorientadora: Profa. Dra. Renata Falchete do Prado

São José dos Campos

2019

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2019]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Matos, Felipe de Souza

Avaliação do potencial antirreabsortivo de géis de fentolamina e propranolol em reimplantes dentários / Felipe de Souza Matos. - São José dos Campos : [s.n.], 2019.

88 f. : il.

Tese (Doutorado) - - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2019.

Orientador: Cláudio Antonio Talge Carvalho

Coorientadora: Renata Falchete Prado

1. Avulsão dentária. 2. Reimplante dentário. 3. Reabsorção radicular. 4. Bloqueadores adrenérgicos. 5. Fentolamina. I. Carvalho, Cláudio Antonio Talge , orient. II. Prado, Renata Falchete, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

## **BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Adj. Cláudio Antonio Talge Carvalho** (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Profa. Adj. Luana Marotta Reis de Vasconcellos**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Profa. Adj. Flaviana Bombarda de Andrade**

Universidade de São Paulo (USP)

Faculdade de Odontologia de Bauru

Campus de Bauru

**Profa. Dra. Gleyce Oliveira Silva**

Faculdade Anhanguera

Departamento de Odontologia

Campus São José dos Campos

São José dos Campos, 20 de março de 2019.

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Humberto Jorge Goes Matos e Ismênia de Souza Matos,  
pela formação humana, amor, incentivo e apoio incondicional.*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, meu refúgio e minha fortaleza.

A minha família, em especial meus irmãos **Elielba**, **Elaine** e **Jonatan**, pela união, carinho e amizade.

A minha avó **Anilda Nonato**, que nos deixou durante o meu doutorado, pela alegria, exemplo e carinho.

A **Alfrancio Dias**, pelo companheirismo, amizade, força e coragem.

A **Raphael Oliveira**, grande parceiro de viagens e saídas, pela amizade e incentivo.

À **Ayla Macyelle**, pela amizade que se fortaleceu no mestrado e nos uniu no doutorado, compartilhando a vida diária, os momentos de alegria e desafios.

À **Rayana Khoury**, grande amiga e parceira de pesquisa. A sua companhia diária tornou o doutorado mais leve e prazeroso.

À **Alessandra Manchini**, pela parceria e apoio mútuo.

Aos demais **amigos** e **colegas** da pós-graduação da Unesp, pela troca de experiências e aprendizado; pela amizade, motivação e momentos de descontração durante essa jornada.

Ao **Prof. Tit. Sigmar de Mello Rode**, pelo incentivo a minha formação na UNESP, pelo carinho e preocupação constantes durante todo o curso.

À **Profa. Tit. Márcia Carneiro Valera**, pelo exemplo de amor e dedicação à docência e à ciência, pelos ensinamentos, e por ter colaborado de forma significativa na minha formação acadêmica. Obrigado pela confiança depositada em mim e pelas oportunidades de experiência e crescimento profissional.

A minha coorientadora, **Profa. Dra. Renata Falchete do Prado**, a quem devo grande parte de tudo o que aprendi no doutorado como pesquisador. Sua capacidade científica e conhecimento amplo me inspiram. Obrigado por compartilhar todo o seu conhecimento e por me fazer "andar" sozinho.

Ao meu orientador, **Prof. Adj. Cláudio Antonio Talge Carvalho**, por toda experiência clínica e científica compartilhada. Obrigado pelo acolhimento, por me fazer sentir em casa, e por acreditar em mim e me apoiar em todos os meus objetivos. Sou muito feliz e grato por tê-lo como orientador.

Aos demais docentes da área de Endodontia, **Prof. Dr. Frederico Canato Martinho**, **Profa. Adj. Ana Paula Martins Gomes** e **Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo**, pelos ensinamentos que me foram concedidos.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora, em especial **Prof. Adj. Eduardo Bresciani**, pela disposição em sempre ajudar e compartilhar seus conhecimentos em estatística, além de experiência clínica e científica.

À **Profa. Adj. Luana Marotta Reis de Vasconcellos**, por quem tenho grande carinho, respeito e admiração, pelo apoio e críticas construtivas feitas no exame de qualificação que contribuíram para a melhoria da qualidade do trabalho.

Aos meus eternos mestres e amigos, **Profa. Adj. Maria Amália Gonzaga Ribeiro**, minha referência em Endodontia, por ter acreditado em mim e me incentivado a seguir carreira acadêmica, e **Prof. Adj. Luiz Renato Paranhos**, pela significativa contribuição na minha formação acadêmica e forte parceria.

Ao **Prof. Phillip Tomson**, por ter me recebido e me acolhido na University of Birmingham (Inglaterra), possibilitando a realização de um sonho e contribuindo para o meu crescimento pessoal e como pesquisador. Obrigado pela parceria, amizade e constante preocupação com minha felicidade e bem-estar.

À **Profa. Dra. Flávia Goulart da Rosa Cardoso**, pelo exemplo de competência e dedicação ao ensino em Endodontia. Obrigado pelo apoio e incentivo enquanto trabalhei ao seu lado como Professor Bolsista de Endodontia.

A todos os **funcionários** do Instituto de Ciência e Tecnologia da UNESP.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora**, na pessoa do coordenador **Prof. Adj. Alexandre Luiz Souto Borges**.

À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da Bolsa de Doutorado.

À **Faculdade de Odontologia de São José dos Campos** – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, seu **corpo docente, direção e administração**.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para execução desta pesquisa.

*"Pesquisa para constatar, constatando,  
intervenção, intervindo educo e me educo.*

*Pesquisa para conhecer o que ainda não  
conheço e comunicar ou anunciar a novidade."*

*Paulo Freire*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>8</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>10</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 ARTIGO.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Artigo – Matos FS, Khoury RD, Prado RF, Oliveira LD, Valera MC, Tomson PL, Carvalho CAT. Aplicação tópica de bloqueadores adrenérgicos em incisivos de ratos reimplantados tardiamente: avaliação citotóxica, microtomográfica e histomorfométrica / <i>Topical application of adrenergic blockers on late replanted rat incisors: cytotoxic, microtomographic and histomorphometric evaluation</i> .....</b>	<b>15</b>
<b>3 CONSIDERAÇÕES GERAIS .....</b>	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>43</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>49</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>84</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha$ 1-AR	Receptores $\alpha$ 1 Adrenérgicos
$\beta$ 2-AR	Receptores $\beta$ 2 Adrenérgicos
$\mu$ CT	Microtomografia Computadorizada
BSA	Soroalbumina Bovina
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CMC	Carboximetilcelulose
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DAB	Diamino Benzidina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
HBSS	Solução Balanceada de Hanks
HE	Hematoxilina-eosina
HPDFL	Fibroblastos do Ligamento Periodontal Humano
LP	Ligamento Periodontal
OPG	Osteoprotegerina
RANK	Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa $\beta$
RANKL	Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa $\beta$
ROI	Região de Interesse
SNAS	Sistema Nervoso Autônomo Simpático
TRAP	Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato
VOI	Volume de Interesse

Matos FS. Avaliação do potencial antirreabsortivo de géis de fentolamina e propranolol em reimplantes dentários [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2019.

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da aplicação tópica de fármacos bloqueadores adrenérgicos (AR) sobre o processo de reparo periodontal de dentes reimplantados em ratos. Inicialmente, cultura de fibroblastos do ligamento periodontal humano foi utilizada para avaliar qualitativamente a citotoxicidade de soluções etanólicas de fentolamina (bloqueador  $\alpha$ -AR) e propranolol (bloqueador  $\beta$ -AR) em diferentes doses (0,75  $\mu\text{g/mL}$ , 2,5  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$  e 100  $\mu\text{g/mL}$ ), após 24 horas de exposição. Posteriormente, modelo animal de avulsão e reimplante dentário foi utilizado para avaliar o potencial antirreabsortivo do bloqueio adrenérgico local com géis de fentolamina (F) ou propranolol (P), em excipiente de carboximetilcelulose (CMC). Incisivos superiores direitos foram extraídos de 48 ratos Wistar machos, armazenados em guardanapo de papel por 30 minutos, e distribuídos aleatoriamente em oito grupos ( $n=6$ ) de acordo com a medicação intracanal: F0.75, F10 e F100 receberam gel de fentolamina nas concentrações 0,75  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$  e 100  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente; P2.5, P10 e P100 receberam gel de propranolol nas concentrações 2,5  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$  e 100  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente; HC e CMC receberam pasta de hidróxido de cálcio e gel de carboximetilcelulose, respectivamente. Os animais foram eutanasiados 30 dias após o reimplante e as seguintes análises foram realizadas: microtomografia (volume, superfície, proporção e densidade de tecido mineralizado), histomorfometria (áreas de reabsorção radicular inflamatória, reabsorção por substituição, anquilose e reparo periodontal) e histoquímica (atividade osteoclástica). Os dados foram analisados estatisticamente por meio de ANOVA e teste de Tukey ou Kruskal Wallis e teste de Dunn, de acordo com sua normalidade ( $\alpha=5\%$ ). A análise qualitativa da viabilidade celular demonstrou que a dose de 100  $\mu\text{g/mL}$  dos fármacos apresentou alta citotoxicidade, com 100% das células inviáveis, e as demais doses propiciaram viabilidade celular semelhante. As análises microtomográfica e histomorfométrica das amostras *in vivo* não revelaram qualquer diferença estatística significativa entre os fármacos testados e suas diferentes doses ( $p>0,05$ ). No entanto, P10 e F10 apresentaram qualitativamente um melhor resultado, pois foram os únicos grupos classificados com áreas de intenso reparo periodontal (P10) e de discreta reabsorção radicular inflamatória (F10 e P10). O tratamento com F10 e P10 diminuiu significativamente o número de osteoclastos em comparação com as outras medicações tópicas ( $p<0,05$ ). Concluiu-se que a aplicação tópica de géis de fentolamina e propranolol na dose de 10  $\mu\text{g/mL}$  diminuiu significativamente a atividade osteoclástica sem causar efeitos citotóxicos.

Palavras-chave: Avulsão dentária. Reimplante dentário. Reabsorção radicular. Bloqueadores adrenérgicos. Fentolamina. Propranolol.

Matos FS. *Evaluation of the anti-resorptive potential of phentolamine and propranolol gels on tooth replantation [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2019.*

## **ABSTRACT**

*This study aimed to evaluate the effects of topical application of adrenergic (AR) blocking drugs on the periodontal repair process of replanted teeth in rats. First, culture of human periodontal ligament fibroblasts was used to qualitatively assess the cytotoxicity of ethanolic solutions of phentolamine ( $\alpha$ -AR blocker) and propranolol ( $\beta$ -AR blocker) at different doses (0.75  $\mu\text{g/mL}$ , 2.5  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$  and 100  $\mu\text{g/mL}$ ) after 24 hours of exposure. Then, animal model of tooth avulsion and replantation was used to evaluate the anti-resorptive potential of local adrenergic blockade with phentolamine (Ph) or propranolol (Pr) gels, in carboxymethylcellulose excipient (CMC). Maxillary right incisors were extracted from 48 male Wistar rats, stored in paper napkins for 30 minutes, and randomly distributed into eight groups ( $n = 6$ ) according to intracanal medication: Ph0.75, Ph10 and Ph100 received phentolamine gel at concentrations of 0.75  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$  and 100  $\mu\text{g/mL}$ , respectively; Pr2.5, Pr10 and Pr100 received propranolol gel at concentrations of 2.5  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$  and 100  $\mu\text{g/mL}$ , respectively; CH and CMC received calcium hydroxide paste and carboxymethylcellulose gel, respectively. The animals were euthanized 30 days after replantation and the following analyzes were performed: microtomography (volume, surface, proportion and density of mineralized tissue), histomorphometry (areas of inflammatory root resorption, replacement root resorption, ankylosis and periodontal repair) and histochemistry (osteoclastic activity). Data were analyzed statistically by means of ANOVA and Tukey's test or Kruskal Wallis and Dunn's test, according to their normality ( $\alpha = 5\%$ ). The qualitative analysis of cell viability demonstrated that the dose of 100  $\mu\text{g/mL}$  of the drugs presented high cytotoxicity, with 100% of the cells non-viable, and the other doses provided similar cell viability. Microtomographic and histomorphometric analyzes of *in vivo* samples did not reveal any significant statistical difference between the tested drugs and their different doses ( $p > 0.05$ ). However, Pr10 and Ph10 presented qualitatively a better result, as they were the only groups classified with areas of intense periodontal repair (Pr10) and discrete inflammatory root resorption (Ph10 and Pr10). Treatment with Ph10 and Pr10 significantly decreased the number of osteoclasts compared to the other topical medications ( $p < 0.05$ ). It was concluded that topical application of phentolamine and propranolol gels at a dose of 10  $\mu\text{g/mL}$  significantly decreased osteoclastic activity without causing cytotoxic effects.*

*Keywords: Tooth avulsion. Tooth replantation. Root resorption. Adrenergic blockers. Phentolamine. Propranolol.*

## 1 INTRODUÇÃO

Traumatismos dentários representam um sério problema de saúde pública, correspondendo a 5% de todas as lesões pelas quais as pessoas procuram atendimento (DiAngelis et al., 2012). A avulsão dental é considerada um dos mais graves, variando de 0,5 a 3% das lesões traumáticas na dentição permanente e os principais fatores etiológicos nessa dentição são as quedas e os esportes (Andersson et al., 2012). Os incisivos centrais superiores são os dentes mais comumente atingidos, ao passo que a mandíbula raramente é afetada. A idade mais frequente para ocorrência da avulsão é entre 7 e 12 anos de idade, fase essa em que os incisivos permanentes estão erupcionando. O reimplante e a manutenção do dente avulsionado em seu alvéolo são então essenciais até que o crescimento facial esteja completo, quando um tratamento reabilitador permanente pode ser feito (Trope, 2011). Por isso, em casos de avulsão dentária, sempre que possível, o reimplante deve ser o tratamento de escolha e o prognóstico dependerá do dente avulsionado, do tempo extra-alveolar e do meio em que o dente foi armazenado até o procedimento de reimplante, idade, estágio de formação radicular, entre outros fatores. Quando realizado em até 15 minutos após o traumatismo, o reimplante é considerado imediato e o prognóstico é mais favorável (Andersson, Bodin, 1990; Petrovic et al., 2010; Andersson et al., 2012; Khinda et al., 2017). Se o reimplante imediato não for possível, o dente avulsionado deve ser armazenado em um meio que favoreça a prevenção de mais danos aos tecidos. Meios de cultura (Viaspan ou HBSS), leites, solução salina e saliva são, em ordem de preferência, meios recomendados para armazenar dentes avulsionados antes do reimplante (Trope, 2002; Petrovic et al., 2010; Andersson et al., 2012).

No entanto, mesmo respeitando as condições ideais de tempo e armazenamento extra-alveolar, o sucesso do reimplante dentário é limitado. Grande parte dos dentes reimplantados é perdida principalmente pela ocorrência de reabsorção radicular externa, interna e anquilose, o que incita a busca por outras estratégias de tratamento na tentativa de prevenir ou minimizar as complicações decorrentes do trauma e, conseqüentemente, manter o dente no alvéolo por um período mais longo (Andreasen et al., 1995a, 1995b; Hecova et al., 2010; Petrovic et

al., 2010; Andersson et al., 2012; Holan, 2013; Roskamp et al., 2018). Apesar de já existirem relatos de que diversos protocolos de tratamento da superfície radicular, como laserterapia e aplicação de bifosfonatos, melhoram o processo de reparo periodontal em dentes reimplantados (Carvalho et al., 2012, 2016, 2017; Vilela et al., 2012; Matos et al., 2016; Najeeb et al., 2017), seus efeitos ainda são restritos aos modelos animais e inconclusivos devido às diferenças nos protocolos terapêuticos, modelos experimentais e ao grande número de variáveis que podem alterar a resposta dos tecidos biológicos. Além disso, nenhum deles foi capaz de impedir completamente a instalação de processos reabsortivos e melhorar a sobrevivência de dentes avulsionados. Estima-se que 60 a 85% dos dentes reimplantados sejam reabsorvidos e perdidos 4 a 6 anos após a lesão (Wimolsantirungsri et al., 2018; Andreasen et al., 1995c).

O mecanismo de inibição das reabsorções tem sido atribuído ao decréscimo da atividade osteoclástica por recrutamento diminuído de clastos, à interferência sobre os receptores específicos dos osteoclastos para proteínas da matriz óssea, à produção de um inibidor osteoclástico por osteoblastos, que reduzem o tempo de vida e/ou o número de osteoclastos diferenciados, e à paralização da reabsorção pela interferência com o bordo pregueado dos osteoclastos (Trope, 2011; Panzarini et al., 2013; Bastos et al., 2015, 2017; Ahn et al., 2016). Como visto na literatura, uma das vias comuns de secreção de moléculas moduladoras da reabsorção óssea é através de receptores ligantes (sistema RANK/RANKL/OPG) presentes em células secretoras de citocinas. O RANK e seu ligante (RANKL) desempenham papel fundamental no desenvolvimento dos osteoclastos. A ligação do RANKL, expresso na superfície dos osteoblastos, ao seu receptor RANK, expressado na superfície de monócitos, impulsionam sinais de diferenciação dos monócitos em osteoclastos (osteoclastogênese), promovendo a reabsorção óssea. A osteoprotegerina (OPG), outra proteína expressa na superfície dos osteoblastos, inibe a diferenciação e atividade dos osteoclastos ligando-se ao RANKL e impedindo sua ligação ao RANK, preservando a integridade óssea (Saito et al., 2011; Panzarini et al., 2013).

Um achado interessante de pesquisas nas últimas décadas é de que a liberação de neurotransmissores adrenérgicos, como a adrenalina e a noradrenalina, e sua ligação aos receptores para tais neurotransmissores, entre eles o receptor adrenérgico  $\beta_2$  ( $\beta_2$ -AR), presente na superfície de osteoblastos e outras células do

ligamento periodontal (LP), parece regular a remodelação óssea, estando esta, então, sob controle do sistema nervoso autônomo simpático (SNAS). Evidências demonstram que esse sistema regula de forma negativa e positiva a formação e reabsorção óssea, respectivamente, através da sinalização de  $\beta$ 2-AR que, ao se ligar ao neurotransmissor adrenérgico, aumenta a expressão de RANKL, estimulando a diferenciação osteoclástica (Ducy et al., 2000; Takeuchi et al., 2001; Takeda et al., 2002; Togari, 2002, 2005; Harada et al., 2003; Elefteriou et al., 2005). Alguns estudos comprovaram que ratos com simpatectomia química periférica ou com bloqueio químico de receptores  $\beta$ 2-AR por administração de propranolol ( $\beta$ -bloqueador) exibiram redução significativa da perda óssea alveolar e inibição da progressão da periodontite em um modelo experimental de doença periodontal (Breivik et al., 2005; Rodrigues et al., 2012). Fonseca et al. (2011) relataram que os receptores  $\beta$ 2-AR não são os únicos adrenoreceptores envolvidos na regulação da remodelação óssea e mostrou que a sinalização pelos receptores  $\alpha$ 1 ( $\alpha$ 1-AR) também pode mediar as ações do SNAS nos tecidos mineralizados. O bloqueio  $\alpha$ 1-AR utilizando a fentolamina também foi identificado como um alvo terapêutico potencial para o tratamento da doença periodontal, pois foi capaz de reduzir significativamente as citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 no periodonto inflamado de ratos (Lu et al., 2014).

Estes achados sugerem que o SNAS afeta principalmente a reabsorção óssea e não a sua formação. Essa afirmação foi confirmada pela demonstração de que o propranolol reduz os marcadores de osteoclastos, mas não afeta a osteocalcina sérica em camundongos ovariectomizados (Pierroz et al., 2006). Desse modo, bloqueadores adrenérgicos como a fentolamina e o propranolol se mostram como substâncias com potencial terapêutico no tratamento de processos reabsortivos, podendo apresentar efeitos positivos não só na regulação da reabsorção óssea (Pasco et al., 2004; Schlienger et al., 2004; Wiens et al., 2006; Bonnet et al., 2007), como também da reabsorção radicular em dentes reimplantados. No entanto, até o momento, nenhum estudo avaliou a interferência dessa via de sinalização sobre a patogênese inflamatória pós-avulsão e reimplante dentário, bem como os possíveis benefícios de seu controle por meio de bloqueadores farmacológicos adrenérgicos. Essa investigação é de grande relevância porque protocolos de tratamento de dentes avulsionados e reimplantados

como os que foram analisados neste estudo nunca foram testados anteriormente quanto ao seu potencial em reduzir a ocorrência de reabsorção radicular e favorecer o processo de reparo após o reimplante.

Nesse contexto, fundamentada a participação da via de sinalização adrenérgica na patogênese inflamatória periodontal e os efeitos terapêuticos de bloqueadores adrenérgicos sobre o metabolismo ósseo, a presente pesquisa avaliou, *in vitro*, a citotoxicidade de fármacos bloqueadores  $\alpha$ -adrenérgico (fentolamina) e  $\beta$ -adrenérgico (propranolol) sobre fibroblastos do ligamento periodontal humano (HPDFL) e, *in vivo*, o potencial antirreabsortivo ósseo-dentário do bloqueio adrenérgico local com aplicação tópica de géis de fentolamina e propranolol no reimplante dentário tardio em ratos.

## 2 ARTIGO

**2.1 Artigo – Matos FS, Khoury RD, Prado RF, Oliveira LD, Valera MC, Tomson PL, Carvalho CAT. Aplicação tópica de bloqueadores adrenérgicos em incisivos de ratos reimplantados tardiamente: avaliação citotóxica, microtomográfica e histomorfométrica / *Topical application of adrenergic blockers on late replanted rat incisors: cytotoxic, microtomographic and histomorphometric evaluation\****

### RESUMO

Antecedentes/Objetivo: As propriedades anti-inflamatória e antiosteoclastogênica de fármacos bloqueadores adrenérgicos também podem ter efeitos antirreabsortivos promissores para prevenir a reabsorção radicular quando os dentes são reimplantados por causa da avulsão traumática. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da aplicação tópica de géis de fentolamina (bloqueador  $\alpha$ -adrenérgico) e propranolol (bloqueador  $\beta$ -adrenérgico) no processo de reparo de incisivos de ratos reimplantados tardiamente. Material e métodos: A viabilidade celular de fibroblastos do ligamento periodontal humano (HPDLF) expostos a diferentes concentrações de soluções de fentolamina (Ph 0,75  $\mu\text{g/ml}$ , Ph 10  $\mu\text{g/ml}$ , Ph 100  $\mu\text{g/ml}$ ), propranolol (Pr 2,5  $\mu\text{g/ml}$ , Pr 10  $\mu\text{g/ml}$ , Pr 100  $\mu\text{g/ml}$ ), e etanol (Eth 0,1  $\mu\text{l/ml}$ , Eth 1  $\mu\text{l/ml}$ , Eth 10  $\mu\text{l/ml}$ ) durante 24 h foi determinada. Quarenta e oito incisivos superiores direitos foram extraídos de ratos Wistar machos, armazenados em guardanapos de papel por 30 min e alocados aleatoriamente em um dos oito grupos ( $n = 6$ ). As raízes expostas foram tratadas com um dos seguintes agentes: pasta de hidróxido de cálcio (CH), 0,75  $\mu\text{g/ml}$  de gel de Ph (Ph0.75), 10  $\mu\text{g/ml}$  de gel de Ph (Ph10), 100  $\mu\text{g/ml}$  de gel de Ph (Ph100), 2,5  $\mu\text{g/ml}$  de gel de Pr (Pr2.5), 10  $\mu\text{g/ml}$  de gel de Pr (Pr10), 100  $\mu\text{g/ml}$  de gel de Pr (Pr100), ou gel de carboximetilcelulose de sódio (CMC), antes do reimplante. 30 dias após a cirurgia, os animais foram eutanasiados e a hemimaxila direita foi removida para realização das seguintes análises: micro TC (volume, superfície, proporção e densidade de tecido mineralizado), histomorfometria (reabsorção radicular inflamatória, reabsorção radicular por substituição, perímetro com anquilose e reparo periodontal) e atividade osteoclástica. Resultados: Altas doses de Pr100 e Ph100 e etanol (10  $\mu\text{l/ml}$ ) foram citotóxicas e mataram 100% dos HPDLF. A presença de osteoclastos ativos foi significativamente menor ( $P < 0,05$ ) nos grupos Ph10 e Pr10. Essas intervenções mostraram uma reabsorção radicular inflamatória qualitativamente menor, e maior reparo periodontal. Conclusões: Os dentes tratados com Ph10 e Pr10 diminuíram significativamente a osteoclastogênese dos dentes reimplantados tardiamente sem causar citotoxicidade.

Palavras-chave: Bloqueadores adrenérgicos. Fentolamina. Propranolol. Reabsorção radicular. Avulsão dentária. Reimplante dentário.

\*Artigo elaborado de acordo com as normas do Periódico *Dental Traumatology* (Print version ISSN 1600-4469). Submetido em: 25/02/2019.

## **ABSTRACT**

*Background/Aim: The anti-inflammatory and anti-osteoclastogenesis properties of adrenergic blocking drugs may also have promising anti-resorptive effects to prevent root resorption when teeth are replanted because of traumatic avulsion. The aim of this study was to investigate the effects of the topical application of phentolamine ( $\alpha$ -adrenergic blocker) and propranolol ( $\beta$ -adrenergic blocker) gels on the repair process of late replanted rat incisors. Material and methods: Cell viability of human periodontal ligament fibroblasts (HPDLF) exposed to different concentrations of phentolamine (Ph 0.75  $\mu\text{g/ml}$ , Ph 10  $\mu\text{g/ml}$ , Ph 100  $\mu\text{g/ml}$ ), propranolol (Pr 2.5  $\mu\text{g/ml}$ , Pr 10  $\mu\text{g/ml}$ , Pr 100  $\mu\text{g/ml}$ ), and ethanol (Eth 0.1  $\mu\text{l/ml}$ , Eth 1  $\mu\text{l/ml}$ , Eth 10  $\mu\text{l/ml}$ ) solutions for 24 h was determined. Forty-eight maxillary right incisors were extracted from male Wistar rats, stored in paper napkins for 30 min and randomly allocated to one of eight groups ( $n = 6$ ). The exposed roots were treated with one of the following agents: calcium hydroxide paste (CH), 0.75  $\mu\text{g/ml}$  Ph gel (Ph0.75), 10  $\mu\text{g/ml}$  Ph gel (Ph10), 100  $\mu\text{g/ml}$  Ph gel (Ph100), 2.5  $\mu\text{g/ml}$  Pr gel (Pr2.5), 10  $\mu\text{g/ml}$  Pr gel (Pr10), 100  $\mu\text{g/ml}$  Pr gel (Pr100), or sodium carboxymethylcellulose gel (CMC), before replantation. 30 days following surgery the animals were euthanized and the right hemimaxilla was removed in order to perform the following analyzes: microCT (volume, surface, proportion, and density of mineralized tissue), histomorphometric (inflammatory root resorption, replacement root resorption, perimeter with ankylosis, and periodontal repair) and determine osteoclastic activity. Results: High doses of Pr100 and Ph100 and ethanol (10  $\mu\text{l/ml}$ ) were cytotoxic and killed 100% of the HPDLF. The presence of active osteoclasts was significantly lower ( $P < 0.05$ ) in the Ph10 and Pr10 groups. These interventions showed qualitatively lower inflammatory root resorption and the highest periodontal repair. Conclusions: Ph10 and Pr10 treated teeth significantly decreased osteoclastogenesis of delayed replanted teeth without causing cytotoxicity.*

*Keywords: Adrenergic blockers. Phentolamine. Propranolol. Root resorption. Tooth avulsion. Tooth replantation.*

## **INTRODUCTION**

*The maintenance of periodontal ligament (PDL) cell vitality and preventing root surface contamination are crucial determinants of the success or otherwise of tooth replantation after avulsion. Replantation carried out within 15 minutes of avulsion of the tooth is defined as ideal because the chances of PDL regeneration and restoring normal function of the tooth are significantly higher, as dehydration of vital tissues is prevented and, consequently, necrosis of the PDL and pulp is less likely.<sup>1-4</sup> Unfortunately, in most situations involving tooth avulsion, teeth are rarely replanted within this time period, since patients, parents and professionals are not*

aware of or are unable to perform the replantation immediately after the accident.<sup>5-8</sup> If the avulsed tooth is not immediately stored in a suitable medium such as Hank's balanced salt solution (HBSS) or milk, the PDL becomes necrotic and can act as a potent inflammatory stimulus. Therefore, in situations when dry time is longer than 60 min the PDL will not be expected to heal and its removal is recommended.<sup>1-4,9</sup>

When the tooth is replanted with necrotic or absent PDL, the newly formed bone around the root occupies its space and it will fuse with the cementum and therefore the hard-dental tissues (cementum and dentin) will be incorporated into its continuous physiological remodeling process.<sup>10,11</sup> Unlike bone tissue that is constantly remodeled and undergoes in process of resorption and deposition, the roots of permanent teeth do not have this homeostatic mechanism and if the process of resorption is initiated it can lead to the total loss of root structure and failure of tooth replantation.<sup>2,10-13</sup> It is estimated that 60 to 85% of replanted teeth are reabsorbed<sup>14</sup> and lost 4-6 years after injury.<sup>15</sup> Such poor success rates have led to attempts of temporary dressings being placed in the root canal with the aim of preserving the root structure after replantation because immediate obturation is not effective in the control of inflammatory resorption.<sup>16-18</sup>

Inhibiting resorption is mainly attributed to the suppressing recruitment of osteoclasts and decreasing clastic activity. Such recruitment is under control of the system of receptors from the tumor necrosis factor (TNF) superfamily, including osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor Kappa-B ligand (RANKL) which are both expressed on the surface of osteoblasts.<sup>19-22</sup> Several treatment strategies have already been studied with the aim of preventing or delaying osteoclast-mediated root resorption after replantation, such as use of fluoride,<sup>23</sup> zoledronic acid,<sup>24</sup> acetazolamide,<sup>25</sup> local or systemic antibiotics,<sup>12,18</sup> Ledermix,<sup>26</sup> indomethacin,<sup>27</sup> bisphosphonates<sup>28</sup> and laser therapy.<sup>29-31</sup> To date, none of these techniques have been able to reduce the amount of resorption to cementum/dentin and improve survival of the avulsed teeth.

Experimental studies in animal models of periodontal disease have suggested that the sympathetic nervous system (SNS) can influence the regulatory pathway of RANKL-mediated osteoclastogenesis, through the release of adrenergic neurotransmitters such as epinephrine and norepinephrine in the periodontium in response to stress. These neurotransmitters in turn bind to  $\alpha$ 1- ( $\alpha$ 1-AR) and  $\beta$ 2-

adrenergic ( $\beta$ 2-AR) receptors present on the surfaces of osteoblasts and other PDL cells which causes an increase in RANKL expression, stimulation of osteoclastic differentiation, affect immune cell proliferation and the production of cytokines.<sup>32–35</sup> On the other hand, blockade of  $\alpha$ 1-AR and  $\beta$ 2-AR in periodontal tissue by phentolamine and propranolol, respectively, has been shown to reduce the level of inflammatory cytokines, inhibit the formation of osteoclasts, and prevent bone loss in the inflamed periodontium.<sup>33–36</sup>

Utilizing adrenergic blockers in the control of osteoclastic activity through the adrenergic signaling pathway provides an opportunity to assess therapeutic interventions which modulate these pathways. This work investigated the effects of different doses of phentolamine (non-selective  $\alpha$ 1-AR blocker) and propranolol (non-selective  $\beta$ 2-AR blocker) gels on the repair process of late replanted rat incisors and on osteoclastogenesis. Our aim was to evaluate the effectiveness and ideal dose of the topical application of these adrenergic blocking agents in the control of root resorption by micro-computed tomographic ( $\mu$ CT) and histomorphometric analysis in an animal model.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cytotoxicity**

The protocol for cytotoxic analysis was approved by the local Institute Review Board (CAAE: 51548015.4.0000.0077). Phentolamine hydrochloride (Ph) and Propranolol hydrochloride (Pr) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) were dissolved in absolute ethanol (Eth) at a ratio of 10 mg/ml, according to the manufacturer's recommendations and further diluted in culture medium to obtain the experimental doses as follows: Ph 0.75  $\mu$ g/ml, Ph 10  $\mu$ g/ml, Ph 100  $\mu$ g/ml, Pr 2.5  $\mu$ g/ml, Pr 10  $\mu$ g/ml, and Pr 100  $\mu$ g/ml. For each drug, a low dose (Ph 0.75  $\mu$ g/ml and Pr 2.5  $\mu$ g/ml) was determined based on the minimal therapeutic plasma concentration of phentolamine (15 ng/ml) and propranolol (50 ng/ml) respectively and on a proportion of drug release by 2% sodium carboxymethylcellulose (CMC) gel (Farmácia de Manipulação Terapêutica, São José dos Campos, SP, Brazil) according to previous

studies.<sup>37–39</sup> Doses of 10 µg/ml and 100 µg/ml were defined as intermediate and high doses, equivalent for both drugs, approximately 10- and 100-fold higher concentration than the lower dose of the drugs (Ph 0.75 µg/ml).

Human periodontal ligament fibroblasts (HPDLF) (passage 7) obtained from the cell bank of the Laboratory of Cell Culture, Department of Restorative Dentistry, Institute of Science and Technology (Unesp), were cultured in a 96-well plate (Prolab®, São Paulo, SP, Brazil) at a density of  $8 \times 10^3$  cells/well. Once cells were attached, 200 µL of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Cutilab Ltda., Campinas, SP, Brasil) and 1% penicillin and streptomycin (PenStrep; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) were added in each well and incubated at 37° C and 5% CO<sub>2</sub> for 24 hours. The culture medium was removed from each well and replaced by 200 µL/well of the experimental drug solutions. The experimental groups were divided according to the doses of the adrenergic blocker drugs and to control, the corresponding solvent ethanol volume was also exposed to the culture: Ph 0.75 µg/ml, Ph 10 µg/ml, Ph 100 µg/ml, Pr 2.5 µg/ml, Pr 10 µg/ml, Pr 100 µg/ml, Eth 0.1 µl/ml, Eth 1 µl/ml, and Eth 10 µl/ml. A group with only normal culture medium (DMEM, 10% FBS and 1% PenStrep) served as control. For each group, five wells were used. After incubation for 24 hours, a representative microscopic image of each well was obtained to compare cell viability among groups. Experimental groups that showed unequal confluence or cell distribution compared to the control were considered cytotoxic.

### **Tooth replantation animal model**

The protocol for animal experimentation was reviewed and approved by the local Animal Research Ethics Committee (Process n. 001/2016). Sample size was calculated using G\*Power software based on preliminary data from a pilot study considering an equivalence limit of 20% found by Carvalho et al.,<sup>30</sup> to which no significant statistical difference was detected between the groups, significance level of 5% and beta power of 80%. It was determined a total of six animals per group. Forty-eight male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*), weighing 200-250 g, were used. Tooth extraction of the maxillary right incisor of each rat was performed as described by Matos et al.<sup>31</sup> Teeth were stored in paper napkins (Santer®, Paper

Factory Santa Therezinha SA, Bragança Paulista, SP, Brazil), at room temperature, for a period of 30 minutes, to simulate delayed replantation.<sup>25</sup> The dental papilla and periodontal ligament adhered to the root surface were removed using a #15 scalpel blade (Suzhou Kyuan Medical Apparatus Co. Ltd., Beiqiao Town, Suzhou City, China) and the pulp tissue was excised with a #20 Hedstroem file (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) through apical foramen. The root canal and the external root surface of each tooth were irrigated with 5 mL of saline solution (Farmax, Divinópolis, MG, Brazil), and the canals were dried with #20 sterile absorbent paper points (Dentsply Ind. And Com. Ltda., Petrópolis, RJ, Brazil).

Teeth were randomly divided into eight groups ( $n = 6$ ) according to the topical medication applied inside the root canal: CH – calcium hydroxide P.A. + saline solution (1 g/ml) (control) ; Ph0.75 – phentolamine hydrochloride + CMC gel (0.75  $\mu$ g/ml); Ph10 – phentolamine hydrochloride + CMC gel (10  $\mu$ g/ml); Ph100 – phentolamine hydrochloride + CMC gel (100  $\mu$ g/ml); Pr2.5 – propranolol hydrochloride + CMC gel (2.5  $\mu$ g/ml); Pr10 – propranolol hydrochloride + CMC gel (10  $\mu$ g/ml); Pr100 – propranolol hydrochloride + CMC gel (100  $\mu$ g/ml); and CMC – CMC gel (placebo). The operative field was swabbed with 0.12% chlorhexidine gluconate (Colgate-Palmolive Industrial Ltda., São Bernardo do Campo, SP, Brazil) and the socket irrigated with 2 mL of saline solution. Excess moisture was removed from the socket and the root surface of the tooth to be replanted was coated with the same topical medication that was applied in the root canal as was the lining of the tooth socket, except for the CH group that only received calcium hydroxide paste in the root canal. Each root canal, root surface and alveolus were filled with about 15  $\mu$ l of the respective topical medications using 25 x 0.35 mm capillary tips (UltraCal TM XS, Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, USA). Teeth were replanted into their socket as described by Matos et al.<sup>31</sup> The animals received a single intramuscular injection (0.005 ml/100 g) of an antibiotic (Megacilin Super Plus TM; Vansil Ind. Com. e Repr. Ltda., Descalvado, SP, Brazil) to reduce the chance of post-operative infection.

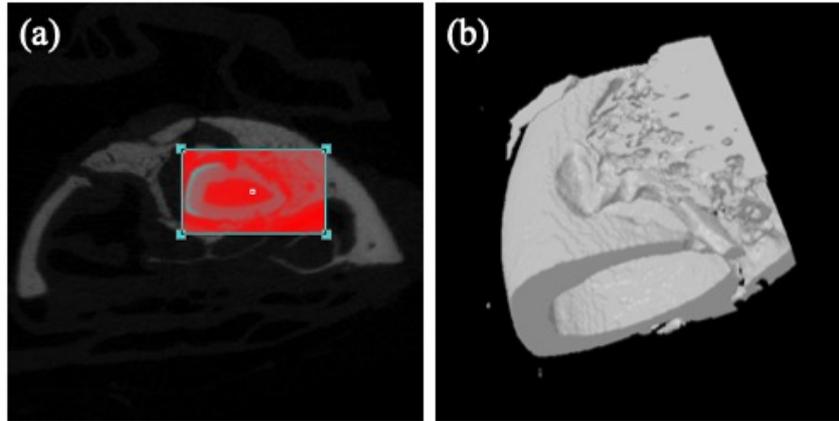
Thirty days after replantation, all animals were anesthetized with ketamine (75 mg/kg; Dopalen<sup>®</sup>, Agribands do Brasil Ltda., Paulínia, SP, Brazil) and xylazine (50 mg/kg; Anasedan<sup>®</sup>; Rompun-Bayer, São Paulo, SP, Brazil) by intramuscular injection, and euthanized by transcardial perfusion with 10% formaldehyde and

guillotine decapitation. The maxilla was dissected from the cranium and the right side containing the replanted incisor was removed using a #20 scalpel blade and a Metzenbaum scissors (Golgran Ind. Com. Instr. Odontológico Ltda., São Paulo, SP, Brazil). The anatomic pieces were fixed in 10% formaldehyde solution for 48 hours, at room temperature, in preparation for  $\mu$ CT analysis.

### **Microtomography**

Experimental and control fixed tissue blocks were scanned with  $\mu$ CT scanner (SkyScan 1176 in vivo, Skyscan, Kontich, Belgium) at a resolution of 9  $\mu$ m. Resulting images were reconstructed two-dimensionally (2D) with NRecon software (v1.6.9.8, SkyScan, Bruker microCT) and three-dimensionally (3D) with Data Viewer software (v1.5.0.2, SkyScan, Bruker microCT). The volume of interest (VI) chosen to perform the measurements corresponded to the middle third of the root and adjacent alveolar bone, composed of 201 transaxial sections, because this region is not damaged by the surgical procedures.<sup>31,40</sup> Transaxial and 3D images of each sample were quantitatively evaluated with regard to volume – TV ( $\text{mm}^3$ ), surface – TS ( $\text{mm}^2$ ), proportion – TV/VI (%), and density – TS/VI ( $\text{mm}^{-1}$ ) of mineralized tissue using CTAn software (v1.13.11.0, SkyScan, Bruker microCT). A rectangular block of 3.5 x 2.1 cm was virtually centered over a particular point of the transaxial image to guarantee a comparative analysis of mineralized tissue within the same region of interest (ROI) for all the samples. The dimensions of the rectangle were defined to encompass the entire contour of the root walls, with its major axis oriented in the buccal-palatine direction, from the outermost border of the vestibular wall to the adjacent palatine alveolar bone.

The VI was reconstructed and visualized in a 3D profile with CTVol software (v2.2.3.0, SkyScan, Bruker microCT). Figure 1 shows representative image of the 2D standardization of the ROI and a 3D image of the reconstructed VI after quantitative analysis. Normally distributed (Shapiro-Wilk test) data was compared and statistical differences between groups were determined by analysis of variance (ANOVA) at a significance level of 0.05.



**Figure 1** – (a) Transaxial image showing 2D standardization of the ROI by using a rectangular geometric figure with 3.5 cm wide and 2.1 cm high (CTAn software). (b) 3D image of the reconstructed VI after quantitative analysis (CTVol software).

### **Histomorphometric analysis**

After  $\mu$ CT analysis, tissue samples were decalcified in 10% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution for 3 months, with exchanges of EDTA every 48 hour. Samples were rinsed, exposed to a serial dehydration with increasing concentration of ethanol, diaphanized and embedded in paraffin. Three semi-serial sections (5  $\mu$ m thick) at 40- $\mu$ m intervals were obtained from each sample in a longitudinal plane of the root and stained with hematoxylin-eosin (H&E). Images of the histological sections were captured using Panoramic Desk (3DHISTECH Ltd., Budapest, Hungary) and Panoramic Scanner software (3DHISTECH Ltd., Budapest, Hungary), totaling 144 images. The histomorphometric analysis was performed on the middle third of the palatal root face and adjacent alveolar bone because this region is not damaged by the surgical procedures and it presents cementum and PDL.<sup>31,40,41</sup> The Panoramic Viewer software (v1.15.4, 3DHISTECH Ltd., Budapest, Hungary) was used to standardize the area of analysis. A trained blinded examiner used Leica Application Suite software (v4.10; Leica Microsystems Ltd., Heerbrugg, Switzerland) to calculate areas of inflammatory root resorption – IR (dentin resorption areas filled with connective tissue and inflammatory cells), replacement root resorption – RR (dentin resorption areas with bone deposition), perimeter with ankylosis – PA (direct union of bone tissue with intact cementum), and periodontal repair – PR (intact cementum covered by connective tissue).<sup>29,31,40</sup> The perimeter corresponding to each event was measured in micrometers, transformed

into percentages in relation to the total perimeter analyzed, and classified in semi-quantitative scores adapted from Carvalho et al.<sup>30</sup>: 1-absent (absence of IR, RR, PA or PR), 2-discrete (presence of IR, RR, PA or PR in <25% of perimeter observed), 3-moderate (presence of IR, RR, PA or PR in 25-50% of perimeter observed), and 4-intense (presence of IR, RR, PA or PR in >50% of perimeter observed). The distribution of scores were determined by Shapiro-Wilk test and data compared using Kruskal-Wallis test at significance level of 0.05.

### **Osteoclast activity**

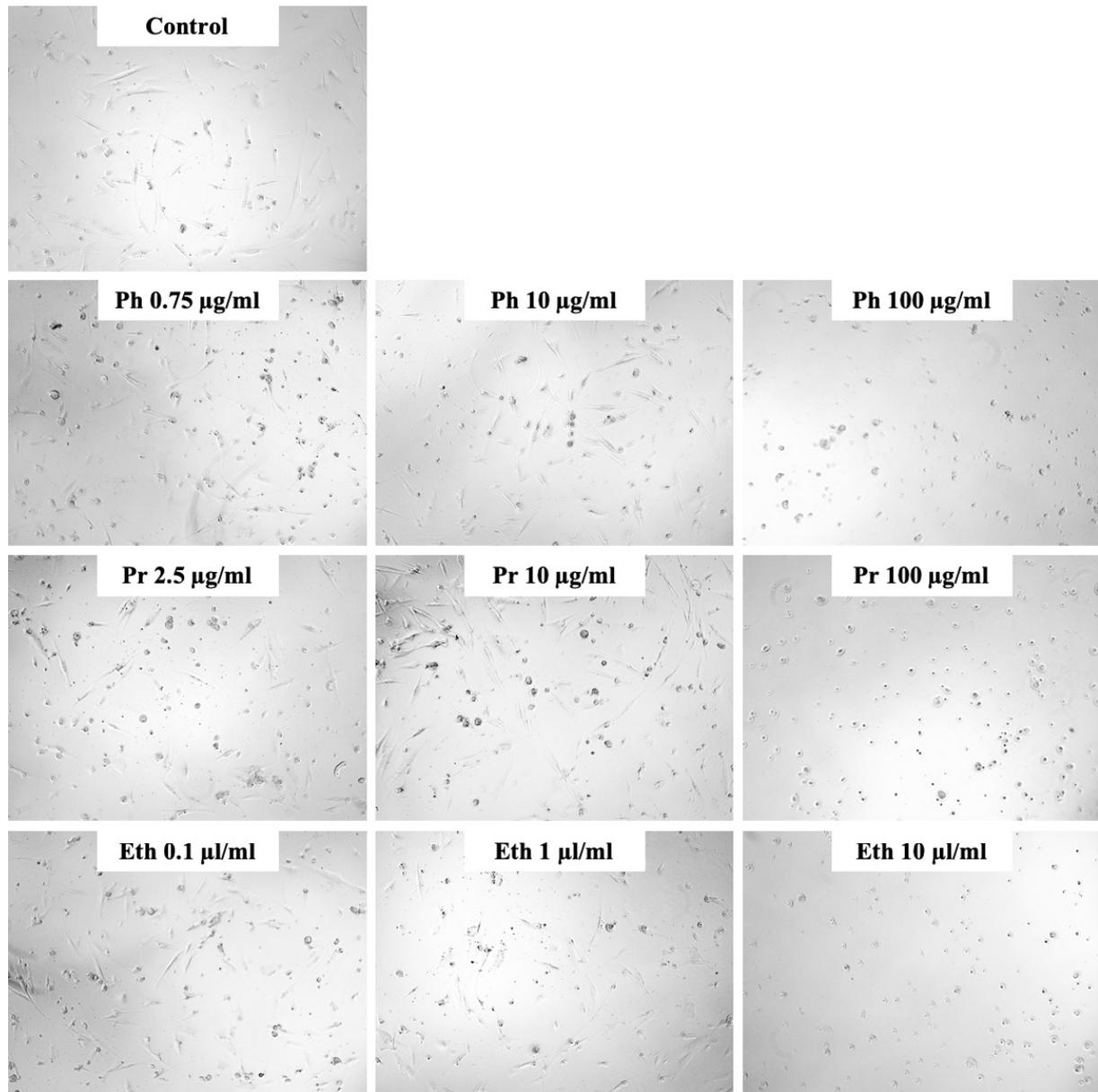
To evaluate osteoclast activity, three semi-serial longitudinal sections from each sample were cut at a thickness of 5  $\mu\text{m}$ , at 40- $\mu\text{m}$  intervals, and stained with a tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) kit (SigmaAldrich®, St Louis, MO, USA), according to the manufacturer's instructions. Briefly, the sections were rehydrated, rinsed, incubated in a solution of naphthol AS-BI phosphoric acid and Fast Garnet GBC for 1 h at 37° C and then stained with hematoxylin. Images of the histological sections were captured using Panoramic Desk and Panoramic Scanner software, totaling 144 images, and analysis was performed on the alveolar bone adjacent to the palatal face of the middle third of the root. The Panoramic Viewer software was used to standardize the area of analysis. For each image, TRAP-positive cells containing 2 or more nuclei were determined by a blinded and trained examiner using Panoramic Viewer software. Data obtained were registered and presented as the means observed in each group. The significance of the differences among the groups was determined by ANOVA followed by the Tukey test for multiple comparisons ( $\alpha = 5\%$ ).

## **RESULTS**

### **Cytotoxicity**

After exposure for 24 hours, a dose-dependent response between the adrenergic blocker drugs and HPDLF viability was seen. All HPDLF cells were determined to be non-viable with phentolamine and propranolol at 100  $\mu\text{g/ml}$  and

ethanol at 10  $\mu\text{l/ml}$ . Low and intermediate doses of phentolamine (0.75  $\mu\text{g/ml}$  and 10  $\mu\text{g/ml}$ ), propranolol (2.5  $\mu\text{g/ml}$  and 10  $\mu\text{g/ml}$ ), and ethanol (0.1  $\mu\text{l/ml}$ , and 1  $\mu\text{l/ml}$ ) provided similar cell confluence compared to the control group. Figure 2 presents representative microscopic images of each group, showing viable HPDLF cells with typical fusiform morphology.



**Figure 2** – Representative microscopic images of each group showing a dose-response relationship between the adrenergic blocker drugs and solvent ethanol with the HPDLF viability.

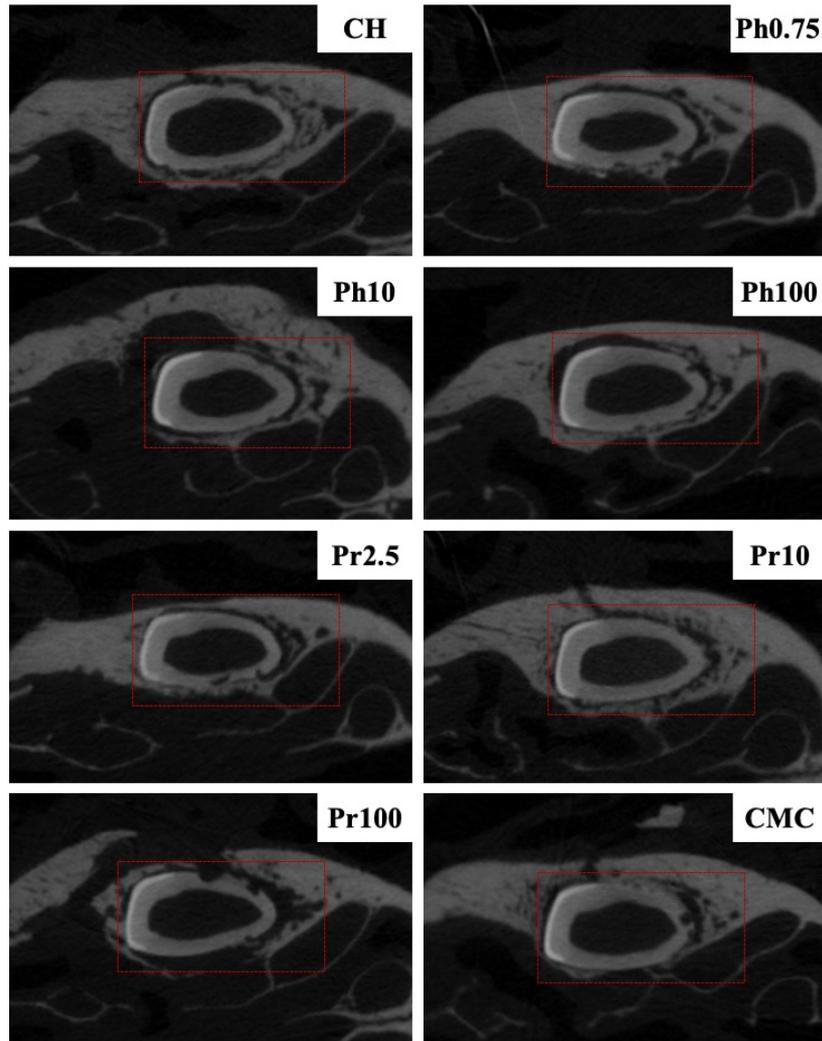
### **Microtomography**

$\mu$ CT analysis of delayed replanted maxillary right incisors treated by different therapeutic regimens revealed no significant statistical difference in comparisons regarding the volume (TV), surface (TS), proportion (TV/VI) and density (TS/VI) of mineralized tissue in the middle third of the root and adjacent alveolar bone (VI) ( $P > 0.05$ ) (Table 1). However, it should be pointed out that CH group presented higher rates of mineralized tissue in relation to the other groups, which was confirmed by a detailed micro-CT analysis of TV and TV/VI ratio. Figure 3 shows representative transaxial  $\mu$ CT images of each group. Greater areas of dentin resorption with bone deposition were found in the CH group.

**Table 1** – Volume (TV), surface (TS), proportion (TV/VI) and density (TS/VI) of mineralized tissue within the volume of interest (VI) for each group (Mean  $\pm$  SD), as detected by micro-CT analysis at 30 days after tooth replantation

<b>Groups</b>	<b>TV (mm<sup>3</sup>)</b>	<b>TS (mm<sup>2</sup>)</b>	<b>TV/VI (%)</b>	<b>TS/VI (mm<sup>-1</sup>)</b>
<b>CH</b>	10.76 $\pm$ 2.83	118.30 $\pm$ 32.76	41.70 $\pm$ 10.98	4.58 $\pm$ 1.26
<b>Ph0.75</b>	8.90 $\pm$ 0.92	102.48 $\pm$ 11.04	34.48 $\pm$ 3.57	3.96 $\pm$ 0.42
<b>Ph10</b>	7.42 $\pm$ 1.48	81.86 $\pm$ 26.78	28.77 $\pm$ 5.76	3.17 $\pm$ 1.03
<b>Ph100</b>	10.04 $\pm$ 2.39	101.59 $\pm$ 30.43	38.90 $\pm$ 9.27	3.93 $\pm$ 1.17
<b>Pr2.5</b>	8.45 $\pm$ 2.69	81.39 $\pm$ 24.66	32.72 $\pm$ 10.42	3.15 $\pm$ 0.95
<b>Pr10</b>	7.95 $\pm$ 2.25	89.95 $\pm$ 19.87	30.82 $\pm$ 8.72	3.48 $\pm$ 0.76
<b>Pr100</b>	8.03 $\pm$ 1.68	80.84 $\pm$ 20.84	31.11 $\pm$ 6.51	3.13 $\pm$ 0.80
<b>CMC</b>	9.96 $\pm$ 2.30	106.82 $\pm$ 16.43	38.58 $\pm$ 8.93	4.13 $\pm$ 0.63

\* Indicate significant statistical difference (ANOVA,  $P < 0.05$ ). No \* in the table as there are no statistically significant comparisons.



**Figure 3** – Representative transaxial micro-CT images of each group obtained with CTAn software at 30 days after tooth replantation.

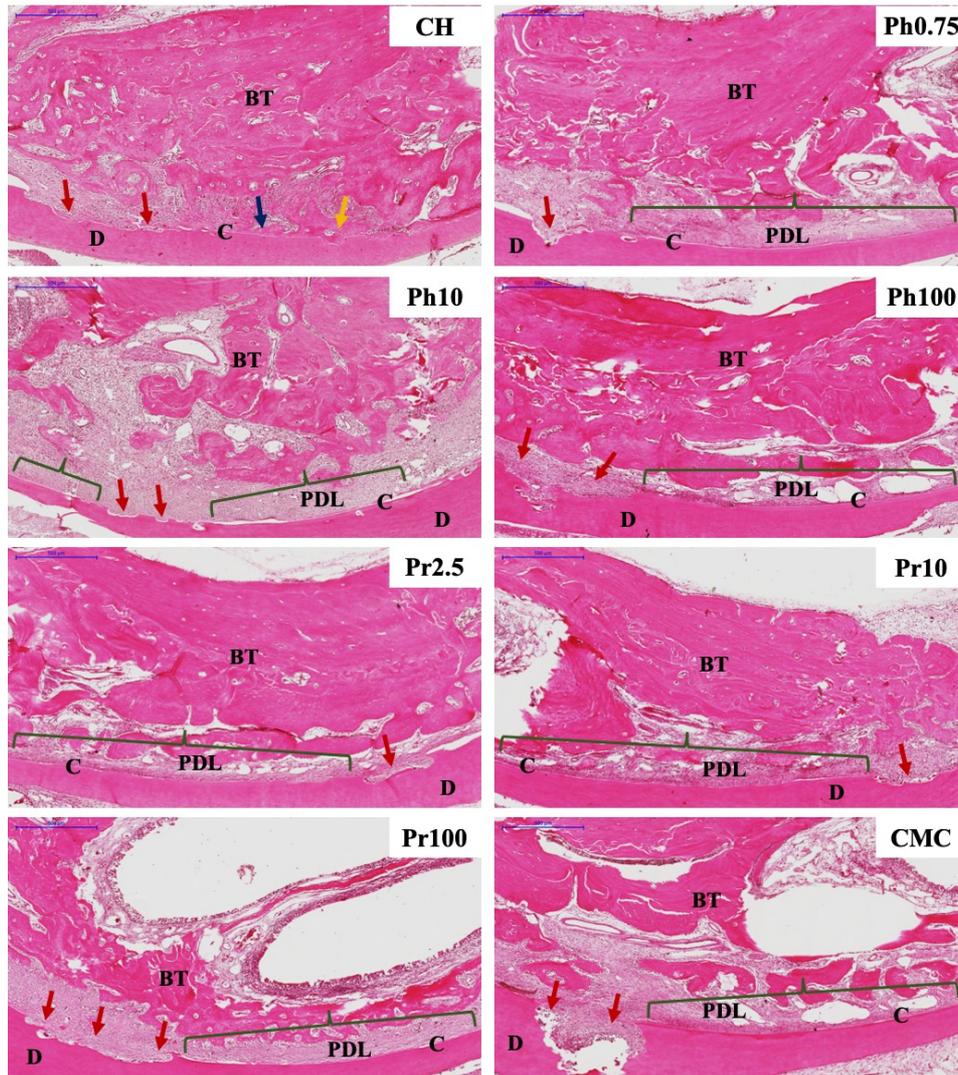
### **Histomorphometric analysis**

Inflammatory root resorption (IR) and periodontal repair (PR) occurred in all experimental groups (Table 2). Replacement root resorption (RR) and ankylosis (PA) were considered absent in all groups except CH. No significant statistical difference was observed among groups in relation to IR, RR, PA and PR scores ( $P > 0.05$ ) when data was compared. Figure 4 shows representative images of each group. Although no statistical difference was determined, Pr10 and Ph10 presented qualitatively a better result overall because they had intense PR (Pr10) and discrete IR (Ph10 and Pr10).

**Table 2** – Scores and medians of the histomorphometric events investigated for each group at 30 days after tooth replantation

Events	Scores	Groups							
		CH	Ph0.75	Ph10	Ph100	Pr2.5	Pr10	Pr100	CMC
IR	1	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6	0/6	0/6	0/6
	2	1/6	2/6	4/6	1/6	1/6	5/6	1/6	1/6
	3	4/6	3/6	1/6	4/6	4/6	1/6	5/6	4/6
	4	1/6	1/6	1/6	1/6	0/6	0/6	0/6	1/6
	<b>Median*</b>	3	3	2	3	3	2	3	3
RR	1	2/6	4/6	5/6	5/6	5/6	4/6	5/6	5/6
	2	2/6	2/6	1/6	1/6	1/6	2/6	1/6	1/6
	3	2/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	4	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	<b>Median*</b>	2	1	1	1	1	1	1	1
PA	1	2/6	4/6	6/6	5/6	5/6	5/6	5/6	5/6
	2	2/6	1/6	0/6	1/6	1/6	1/6	1/6	0/6
	3	2/6	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6
	4	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	<b>Median*</b>	2	1	1	1	1	1	1	1
PR	1	2/6	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	2	3/6	0/6	2/6	0/6	2/6	2/6	1/6	2/6
	3	0/6	4/6	4/6	4/6	2/6	0/6	3/6	2/6
	4	1/6	1/6	0/6	2/6	2/6	4/6	2/6	2/6
	<b>Median*</b>	2	3	3	3	3	4	3	3

\* Indicate significant statistical difference (Kruskal-Wallis test,  $P < 0.05$ ). No \* in the table as there are no statistically significant comparisons. Inflammatory root resorption (IR), replacement root resorption (RR), perimeter with ankylosis (PA), periodontal repair (PR). Semiquantitative scores: 1-absent, 2-discrete, 3-moderate, 4-intense.

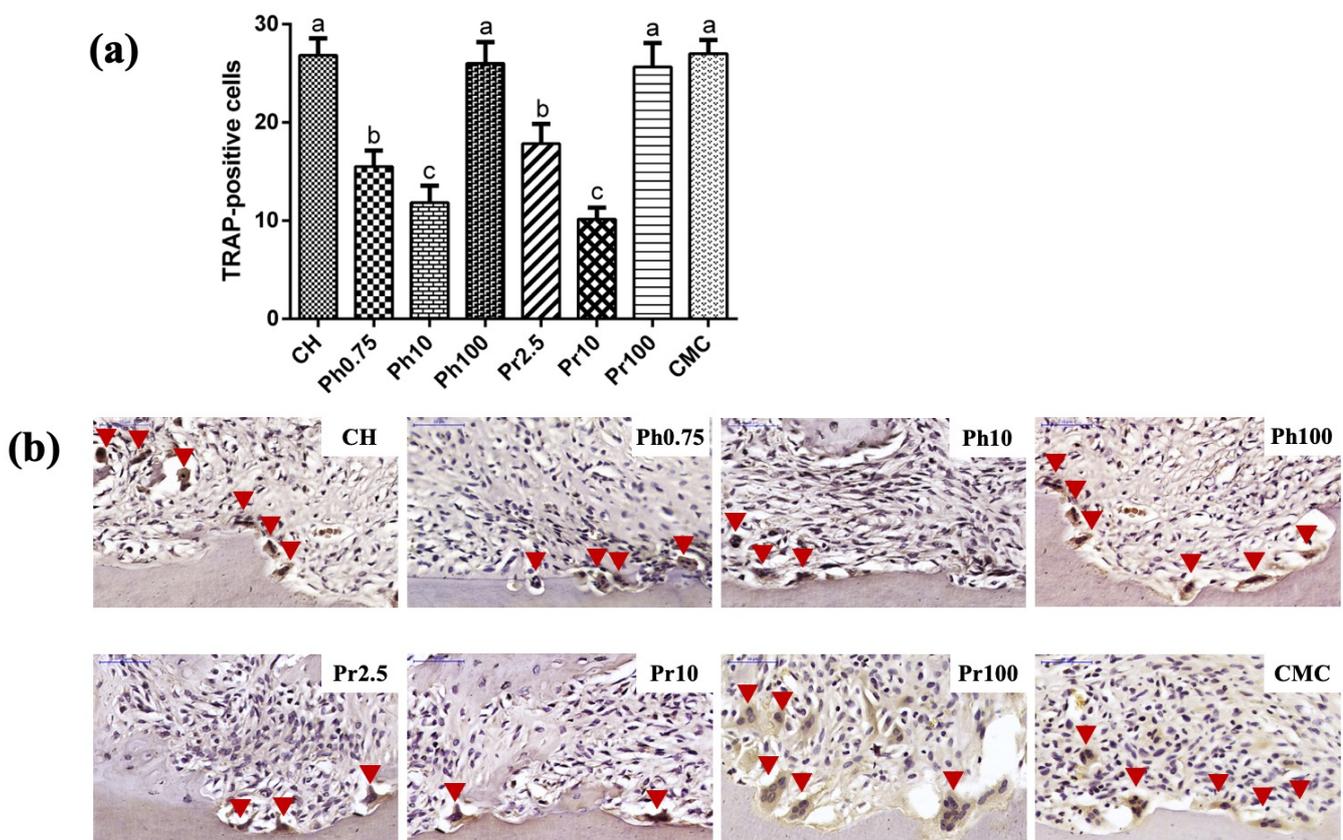


**Figure 4** – Representative images of each group showing areas of inflammatory root resorption (IR = red arrows), replacement root resorption (RR = yellow arrows), perimeter with ankylosis (PA = blue arrows), and periodontal repair (PR = green arrows). Dentin (D), cementum (C), periodontal ligament (PDL), bone tissue (BT). Haematoxylin and eosin stain, scale bar = 500  $\mu$ m in the top left-hand corner of each image.

### **Osteoclast activity**

Topical application of adrenergic blockers in the replanted teeth suppressed osteoclast formation by significantly decreasing the amount of TRAP-positive multinuclear cells in a dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ) (Figure 5a). Treatment with Ph10 and Pr10 significantly decreased the number of TRAP-positive multinuclear cells compared to the other topical medications ( $P < 0.05$ ) (Figure 5a). The number of

TRAP-positive multinuclear cells was significantly higher in the CH, Ph100, Pr100, and CMC groups than in the Ph0.75 and Pr2.5 groups ( $P < 0.05$ ) (Figure 5a), which in turn presented statistically similar results ( $P > 0.05$ ) (Figure 5a). Representative images of each group showing a decrease in the number of TRAP-positive multinuclear cells by treatment with low (Ph 0.75  $\mu\text{g/ml}$ , Pr 2.5  $\mu\text{g/ml}$ ) and intermediate doses (Ph 10  $\mu\text{g/ml}$ , Pr 10  $\mu\text{g/ml}$ ) of both adrenergic blocker drugs are presented in Figure 5b.



**Figure 5** – (a) Mean number of TRAP-positive cells in each group at 30 days after delayed tooth replantation. Bars with different letters differ significantly among each other (ANOVA followed by Tukey's test,  $P < 0.05$ ). (b) Representative images of each group showing TRAP-positive multinuclear cells (red arrowheads). Tartrate-resistant acid phosphatase stain, scale bar = 50  $\mu\text{m}$  in the top left-hand corner of each image.

## **DISCUSSION**

*Although the SNS primary function is to stimulate the body's fight-or-flight response, it is also responsible for other homeostatic mechanisms. Innervation of the SNS has been shown to modulate osteoclastic activity in periodontal tissues through the activation of  $\alpha$ 1-AR and  $\beta$ 2-AR expressed by PDL cells especially osteoblasts/osteoclasts and the pharmacological blockade of these receptors can prevent alveolar bone loss induced by periodontitis.<sup>32-36</sup> The present study hypothesized that the local adrenergic blockade using phentolamine (non-selective  $\alpha$ 1-AR blocker) and propranolol (non-selective  $\beta$ 2-AR blocker) gels as temporary dressing would have beneficial effect on the regulation of bone and root resorption in rat teeth after late replantation following simulated avulsion. To check these assumptions, micro-CT was used in combination with histological analysis due to the limitation of 2D methods.<sup>42</sup> Although these drugs are not antimicrobial, which is thought to be an important property of an agent used to treat an avulsed tooth, both drugs were chosen as therapeutic agents because of their well-known preventive effects on periodontal degradation by inhibiting osteoclastogenesis and reducing the level of inflammatory cytokines.<sup>33-36</sup> The authors proposed the topical application of these agents due to the cardiovascular side effects caused by their systemic administration. Clearly such a side effect is not desirable especially because the clinical challenge of an avulsed tooth is most frequently presented in children aged 7 to 12 years.<sup>43</sup> In this study, CMC gel was used as vehicle for drug delivery because it is a highly viscous mucoadhesive gel which is composed of hydrophilic polymers commonly used for the local delivery of drugs to a diseased mucosa.<sup>44</sup> It provides low irritancy and adaptability to biological surfaces, thus allowing the release of the drug close to the site of action.<sup>44</sup>*

*The findings of the present study suggest that topical application of adrenergic blockers to the pulp chamber and the root surface may influence the process of periodontal destruction of replanted teeth by reducing osteoclastogenesis. The enzyme histochemistry analyzes in this animal model showed that non-toxic concentrations of both low and intermediate doses of phentolamine (Ph0.75, Ph10) and propranolol (Pr2.5, Pr10) significantly decreased the number of TRAP-positive*

cells in a dose-dependent manner. These findings agree with reports that suggest that systemic use of these drugs in rats reduce osteoclastic activity in periodontal disease.<sup>33,34,36</sup> TRAP is a resorptive enzyme found in the ruffled border of the osteoclast's membrane, being considered a specific marker of osteoclast differentiation.<sup>45</sup> Such suppression of osteoclastic formation is reported to be a result of the pharmacological blockade of  $\alpha$ 1-AR and  $\beta$ 2-AR on the surface of osteoblasts, which prevents their binding to adrenergic neurotransmitters, reducing the expression of RANKL, the main inducer of osteoclastogenesis and osteoclastic activity.<sup>19,32,34-36</sup> Similar effects were found by Okada et al.<sup>33</sup> and Rodrigues et al.<sup>34</sup> who reported a reduction in the number of osteoclasts and prevention of the alveolar bone loss in rats with experimental periodontitis after blockade of  $\beta$ -receptors by intraperitoneal or oral administration of propranolol. In addition, the drugs have been shown to reduce the levels of IL-1 $\beta$  (Ph and Pr), IL-6 (Ph), IL-8 (Ph), TNF- $\alpha$  (Pr) and RANKL (Pr) in gingival tissues and increase expression of OPG (Pr).<sup>34,35</sup> It is noteworthy, however, that the beneficial effects observed with these doses for osteoclastogenesis in this study were not enough to induce a significant improvement in periodontal repair, formation and resorption of bone, cementum and dentin.

$\mu$ CT analysis of the middle third of the replanted incisors and surrounding tissues showed no significant difference between groups regarding 2D and 3D parameters quantified. However, teeth treated with CH showed higher rates of mineralized tissue in relation to the other groups. Transaxial images and histomorphometric examination suggest that this discrete increase may be related to a greater occurrence of external root resorption areas with replacement by bone tissue and ankylosis in CH group, while in the other groups lower rates or absence of these events were evident. Calcium hydroxide is the most commonly used root canal dressing after late replantation, and it is considered the medication of choice due to its alkaline pH and bactericidal effect that may slow or avoid inflammatory and replacement root resorption.<sup>46</sup> To observe these effects, a long application time with successive changes is required. Extended dressing times with calcium hydroxide has been associated with a detrimental effect on decreased fracture resistance of root dentin.<sup>17,18,47,48</sup> Studies in primates demonstrated that calcium hydroxide was ineffective in preventing inflammatory and replacement root resorption following tooth replantation.<sup>9,49</sup> It is also possible that calcium hydroxide may diffuse to the

periodontium through the thin dentinal walls via dentinal tubules or apical foramen and cause coagulation necrosis in vital periodontal tissue, triggering release of pro-resorptive inflammatory factors.<sup>5,9,16,50,51</sup> This could explain the greater osteoclast formation found in the CH group similarly to cytotoxic doses (Ph100, Pr100) and placebo group (CMC). At the same time, CH induces the deposition of mineralized tissue by the activation of alkaline phosphatase, an enzyme with important action in this process, and by the release of calcium ions that react with carbon dioxide in the tissues and form granulations of calcium carbonate.<sup>46,52</sup>

Although statistical differences among the histomorphometric scores of the groups were not detected, it was possible to determine qualitatively that as a result of the reduction of osteoclastogenesis, inflammatory root resorption was less, and periodontal repair was greater in the Ph10 and Pr10 groups respectively. Based on this histological assessment, treatment of replanted incisors with low and high doses provided no decrease in the amount of root resorption and no improvement in PDL repair compared to teeth treated with CH or placebo (CMC). The results obtained with high doses of Ph and Pr appear to be consistent with cytotoxic ones, suggesting that they impair cell survival and stimulate local inflammation. While low doses, drug release may not have been sufficient or absorbed at a level in the target tissue to induce an adrenergic blockade which result in more evident histological effects. Although the local dose delivery of adrenergic drugs was not determined as part of this study, it is known that a local release in the 50-100 ng/ml range of propranolol is necessary to induce a beta-receptor blockade.<sup>38</sup> At the other extreme, high doses of non-selective adrenergic blockers such as phentolamine and propranolol can suppress both  $\alpha_1/\alpha_2$  and  $\beta_1/\beta_2$  adrenergic receptors, thereby reducing their beneficial effects via  $\alpha_1$ -AR and  $\beta_2$ -AR.<sup>34,35</sup> While inflammatory root resorption and periodontal repair had better scores in the intermediate dose groups (Ph10, Pr10), other parameters such as replacement root resorption and ankylosis were classified as absent in a similar way in all groups, except CH which presented discrete presence of these events as already discussed.

The beneficial effects of sympathetic receptor blockade on bone metabolism was first demonstrated in a surgically fractured rat model which showed an increase in bone formation rate after a period of 19 consecutive days of treatment with intraperitoneal injections of propranolol (0,1 mg/kg/day).<sup>53</sup> Since then, several studies

have demonstrated the sympathomimetic action on clastic cells equipped with adrenergic receptors, and their effect on the local regulation of osteoclastogenesis under physiological and pathological conditions.<sup>19,34,35</sup> The first evidence that SNS is involved in the pathogenesis of periodontal disease was reported in 2005 when it was demonstrated that rats with peripheral chemical sympathectomy exhibited significant reduction of alveolar bone loss and inhibition of periodontitis progression.<sup>32</sup> To our knowledge, this is the first evidence of the effects of adrenergic blockers on tooth replantation, which may provide a novel therapeutic strategy for managing avulsed teeth by preventing inflammatory root resorption and subsequent ankylosis. Further studies are necessary to assess the effects of the drugs on a longer observation period and to clarify whether the anti-osteoclastogenesis effect observed in this study is indeed due to  $\alpha$ 1-AR and  $\beta$ 2-AR block or due to a general anti-inflammatory effect (eg, suppression of inflammatory cytokines).

In conclusion, the current data reveal that the topical application of phentolamine and propranolol at low (Ph0.75, Pr2.5) and intermediate doses (Ph10, Pr10) does not present a cytotoxic effect for HPDLF. In a 30-day observation period, replanted teeth treated with Pr10 and Ph10 had a better outcome because of a significant reduction in the number of osteoclasts detected by TRAP staining and tissues inspected histologically showed less inflammatory root resorption (Ph10 and Pr10) and larger areas of periodontal repair (Pr10).

#### **Conflict of interest statement**

We certify that do not have any commercial or associate interest that represents a conflict of interest in connection with the submitted manuscript.

#### **Acknowledgments**

The authors would like to thank CNPq (Brazilian National Council for Scientific and Technological Development) for funding the execution of this work (grant n<sup>o</sup>. 431807/2016-7).

## REFERENCES

1. Andersson L, Bodin I. Avulsed human teeth replanted within 15 minutes: a long-term clinical follow-up study. *Endod Dent Traumatol* 1990;6:37–42.
2. Petrovic B, Marković D, Peric T, Blagojevic D. Factors related to treatment and outcomes of avulsed teeth. *Dent Traumatol* 2010;26:52–9.
3. Andersson L, Andreasen JO, Day P, Heithersay G, Trope M, DiAngelis AJ et al. International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2. Avulsion of permanent teeth. *Dent Traumatol* 2012;28:88–96.
4. Is Khinda V, Kaur G, S Brar G, Kallar S, Khurana H. Clinical and practical implications of storage media used for tooth avulsion. *Int J Clin Pediatr Dent* 2017;10:158–65.
5. Marão HF, Panzarini SR, Aranega AM, Sonoda CK, Poi WR, Esteves JC et al. Periapical tissue reactions to calcium hydroxide and MTA after external root resorption as a sequela of delayed tooth replantation. *Dent Traumatol* 2012;28:306–13.
6. Menezes MC, Carvalho RG, Accorsi-Mendonça T, De-Deus G, Moreira E JL, Silva E JNL. Knowledge of dentists on the management of tooth avulsion injuries in Rio de Janeiro, Brazil. *Oral Health Prev Dent* 2015;13:457–60.
7. Antunes LAA, Rodrigues AS, Martins AMC, Cardoso ES, Homsy N, Antunes LS. Traumatic dental injury in permanent teeth: knowledge and management in a group of Brazilian school teachers. *Dent Traumatol* 2016;32:269–73.
8. Cosme-Silva L, Fernandes LA, Rosselli ER, Poi WR, Martins NS, Lima DC. Tooth injuries: knowledge of parents of public school students from the city of Alfenas, Minas Gerais, Brazil. *Dent Traumatol* 2018;34:93–9.
9. Andreasen JO, Kristerson L. The effect of extra-alveolar root filling with calcium hydroxide on periodontal healing after replantation of permanent incisors in monkeys. *J Endod* 1981;7:349–54.
10. Tronstad L. Root resorption - etiology, terminology and clinical manifestations. *Endod Dent Traumatol* 1988;4:241–52.
11. Hammarström L, Blomlöf L, Lindskog S. Dynamics of dentoalveolar ankylosis and associated root resorption. *Endod Dent Traumatol* 1989;5:163–75.
12. Panzarini SR, Gulinelli JL, Saito CTMH, Poi WR, Sonoda CK, Oliveira JA et al.

- Short-term vs long-term calcium hydroxide therapy after immediate tooth replantation: a histomorphometric study in monkey's teeth. Dent Traumatol 2012;28:226–32.*
13. *Roskamp L, Trevilatto PC, Souza CM, Silva Neto UX, Carneiro E, Fariniuk LF et al. Analysis of the association of clinical factors and IL4 gene polymorphisms with root resorption in avulsed teeth after 1 year of replantation. Int Endod J 2018;51:12–9.*
  14. *Wimolsantirungsri N, Makeudom A, Louwakul P, Sastraruji T, Chailertvanitkul P, Supanchart C et al. Inhibitory effect of Thai propolis on human osteoclastogenesis. Dent Traumatol 2018;34:237–44.*
  15. *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.*
  16. *Esteves JC, Marão HF, Silva PIDS, Poi WR, Panzarini SR, Aranega AM et al. Delayed tooth replantation following root canal filling with calcium hydroxide and MTA: histomorphometric study in rats. Arch Oral Biol 2015;60:1254–62.*
  17. *Ferreira MM, Botelho MF, Abrantes M, Carvalho L, Carrilho E. Histologic evaluation of the effect of mineral trioxide aggregate-Fillapex as a root canal sealer in rat teeth submitted to late replantation. Eur J Dent 2017;11:89–93.*
  18. *Brandini DA, Amaral MF, Debortoli CVL, Panzarini SR. Immediate tooth replantation: root canal filling for delayed initiation of endodontic treatment. Braz Oral Res 2018;32:e7.*
  19. *Togari A. Adrenergic regulation of bone metabolism: possible involvement of sympathetic innervation of osteoblastic and osteoclastic cells. Microsc Res Tech 2002;58:77–84.*
  20. *Panzarini SR, Okamoto R, Poi WR, Sonoda CK, Pedrini D, Silva PE et al. Histological and immunohistochemical analyses of the chronology of healing process after immediate tooth replantation in incisor rat teeth. Dent Traumatol 2013;29:15–22.*
  21. *Ahn HJ, Nam OH, Lee H-S, Kim E-C, Cohenca N, Choi SC. Expression of inflammatory cytokines and MMPs on replanted teeth at different extra-alveolar time: an ex vivo and in vivo study. Int J Paediatr Dent 2016;26:301–9.*
  22. *Bastos JV, Silva TA, Colosimo EA, Côrtes MIS, Ferreira DAB, Goulart EMA et al. Expression of inflammatory cytokines and chemokines in replanted permanent teeth with external root resorption. J Endod 2017;43:203–9.*
  23. *Panzarini SR, Nonato CC, Gulinelli JL, Poi WR, Sonoda CK, Saito CTMH et al.*

- Effect of the treatment of root surface-adhered necrotic periodontal ligament with propolis or fluoride in delayed rat tooth replantation. Clin Oral Investig 2013;1–5.*
24. *Mori GG, Janjacom DMM, Nunes DC, Castilho LR. Effect of zoledronic acid used in the root surface treatment of late replanted teeth: a study in rats. Braz Dent J 2010;21:452–7.*
  25. *Mori GG, Poi WR, Castilho LR. Evaluation of the anti-resorptive ability of an experimental acetazolamide paste for the treatment of late replanted teeth: a study in rats. Dent Traumatol 2013;29:34–40.*
  26. *Day PF, Gregg TA, Ashley P, Welbury RR, Cole BO, High AS et al. Periodontal healing following avulsion and replantation of teeth: a multi-centre randomized controlled trial to compare two root canal medicaments. Dent Traumatol 2012;28:55–64.*
  27. *Zanetta-Barbosa D, Moura CCG, Machado JR, Crema VO, Lima CAP, Carvalho ACP. Effect of indomethacin on surface treatment and intracanal dressing of replanted teeth in dogs. J Oral Maxillofac Surg 2014;72:127.e1-9.*
  28. *Najeeb S, Siddiqui F, Khurshid Z, Zohaib S, Zafar MS, Ansari SA. Effect of bisphosphonates on root resorption after tooth replantation - a systematic review. Dent Traumatol 2017;33:77–83.*
  29. *Saito CTMH, Gulinelli JL, Panzarini SR, Garcia VG, Okamoto R, Okamoto T et al. Effect of low-level laser therapy on the healing process after tooth replantation: a histomorphometrical and immunohistochemical analysis. Dent Traumatol 2011;27:30–9.*
  30. *Carvalho FB, Andrade AS, Barbosa AFS, Aguiar MC, Cangussu MCT, Pinheiro ALB et al. Evaluation of laser phototherapy (780 nm) after dental replantation in rats. Dent Traumatol 2016;32:488–94.*
  31. *Matos FS, Godolphim FJ, Correia AMO, Albuquerque Júnior RLC, Paranhos LR, Rode SM et al. Effect of laser photobiomodulation on the periodontal repair process of replanted teeth. Dent Traumatol 2016;32:402–8.*
  32. *Breivik T, Gundersen Y, Opstad PK, Fonnum F. Chemical sympathectomy inhibits periodontal disease in Fischer 344 rats. J Periodontal Res 2005;40:325–30.*
  33. *Okada Y, Hamada N, Kim Y, Takahashi Y, Sasaguri K, Ozono S et al. Blockade of sympathetic B-receptors inhibits Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss in an experimental rat periodontitis model. Arch Oral Biol 2010;55:502–8.*

34. Rodrigues WF, Madeira MFM, Silva TA, Clemente-Napimoga JT, Miguel CB, Dias-Da-Silva VJ et al. Low dose of propranolol down-modulates bone resorption by inhibiting inflammation and osteoclast differentiation. *Br J Pharmacol* 2012;165:2140–51.
35. Lu H, Xu M, Wang F, Liu S, Gu J, Lin S. Chronic stress enhances progression of periodontitis via  $\alpha$ 1-adrenergic signaling: a potential target for periodontal disease therapy. *Exp Mol Med* 2014;46:e118.
36. Shimizu Y, Hosomichi J, Kaneko S, Shibutani N, Ono T. Effect of sympathetic nervous activity on alveolar bone loss induced by occlusal hypofunction in rats. *Arch Oral Biol* 2011;56:1404–11.
37. Bros F, Wolshin EM. Determination of phentolamine in blood and urine by high performance liquid chromatography. *Anal Chem* 1978;50:521–5.
38. Gugler R, Bodem G, Dengler HJ. Pharmacokinetics of beta-receptor-blocking agents in relation to their anti-hypertensive effect. *Clin Sci Mol Med Suppl* 1976;3:473s–475s.
39. Takka S, Rajbhandari S, Sakr A. Effect of anionic polymers on the release of propranolol hydrochloride from matrix tablets. *Eur J Pharm Biopharm* 2001;52:75–82.
40. Santos CLV, Sonoda CK, Poi WR, Panzarini SR, Sundefeld MLMM, Negri MR. Delayed replantation of rat teeth after use of reconstituted powdered milk as a storage medium. *Dent Traumatol* 2009;25:51–7.
41. Eccles JD. The development of the periodontal membrane in the rat incisor. *Arch Oral Biol* 1964;9:127–33.
42. Reis MVP, Moura CCG, Soares PBF, Leoni GB, Souza-Neto MD, Barbosa DZ et al. Histologic and micro-computed tomographic analyses of replanted teeth stored in different kind of media. *J Endod* 2014;40:665–9.
43. Cavalcanti AL, Bezerra PKM, Alencar CRB, Moura C. Traumatic anterior dental injuries in 7- to 12-year-old Brazilian children. *Dent Traumatol* 2009;25:198–202.
44. Rossi S, Bonferoni MC, Ferrari F, Caramella C. Drug release and washability of mucoadhesive gels based on sodium carboxymethylcellulose and polyacrylic acid. *Pharm. Dev Technol* 1999;4:55–63.
45. Kwak HB, Lee BK, Oh J, Yeon J-T, Choi S-W, Cho HJ et al. Inhibition of osteoclast differentiation and bone resorption by rotenone, through down-regulation of RANKL-induced c-Fos and NFATc1 expression. *Bone* 2010;46:724–31.

46. Mohammadi Z, Dummer PMH. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J* 2011;44:697–730.
47. Batur YB, Erdemir U, Sancakli HS. The long-term effect of calcium hydroxide application on dentin fracture strength of endodontically treated teeth. *Dent Traumatol* 2013;29:461–4.
48. Valera MC, Albuquerque MTP, Yamasaki MC, Vassallo FNS, Silva DAESA, Nagata JY. Fracture resistance of weakened bovine teeth after long-term use of calcium hydroxide. *Dent Traumatol* 2015;31:385–9.
49. Dumsha T, Hovland EJ. Evaluation of long-term calcium hydroxide treatment in avulsed teeth: an *in vivo* study. *Int Endod J* 1995;28:7–11.
50. Lengheden A. Influence of pH and calcium on growth and attachment of human fibroblasts *in vitro*. *Scand J Dent Res* 1994;102:130–6.
51. Lengheden A, Jansson L. pH effects on experimental wound healing of human fibroblasts *in vitro*. *Eur J Oral Sci* 1995;103:148–55.
52. Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Júnior O. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissues and bacteria. *Braz Dent J* 1995;6:85–90.
53. Minkowitz B, Boskey AL, Lane JM, Pearlman HS, Vigorita VJ. Effects of propranolol on bone metabolism in the rat. *J Orthop Res* 1991;9:869–75.

### 3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Avulsão dental é uma lesão traumática complexa caracterizada pelo completo deslocamento do dente para fora do alvéolo, expondo-o ao ambiente externo e causando rompimento do feixe neurovascular e do LP. Como consequências, tanto a polpa quanto o LP sofrem extenso dano e se instala um processo inflamatório no periodonto. No exsudato inflamatório é encontrada uma grande quantidade de produtos, como os derivados do sistema de coagulação e fibrinólise, do ácido araquidônico, citocinas, fatores de crescimento, e óxido nítrico (Andersson et al., 2012). Todos são importantes mediadores locais indutores de osteoclasia. O principal deles, a plasmina, interage com os osteoblastos liberando a colagenase que promove perda total do osteóide aposto na superfície óssea. Assim, os cristais de hidroxiapatita ficam expostos e parecem exercer um efeito quimiotático para os clastos que, uma vez acoplados à superfície desnuda da raiz, caracterizam a instalação da unidade modeladora óssea, levando à reabsorção progressiva da estrutura radicular e perda do reimplante (Pierce et al., 1989). Dessa forma, o controle da inflamação e das vias de sinalização envolvidas na osteoclastogênese é fundamental para que ocorra o processo de reparo periodontal após o reimplante (Consolaro, 2013).

Estudos realizados na área da Periodontia demonstraram que, entre os diferentes mecanismos inatos de controle da imunopatogênese periodontal, o SNAS desempenha papel importante por regular a resposta inflamatória e o metabolismo ósseo em condições de saúde e doença (Breivik et al., 2005; Okada et al., 2010; Rodrigues et al., 2012; Lu et al., 2014). Evidências atuais indicam que a administração de agonistas e antagonistas de receptores  $\alpha$ 1-AR e  $\beta$ 2-AR são capazes de regular de forma positiva e negativa, respectivamente, a reabsorção óssea no periodonto, afetando significativamente a progressão da doença periodontal (Okada et al., 2010; Shimizu et al., 2011; Rodrigues et al., 2012; Lu et al., 2014). Diante disso, a presente pesquisa testou a hipótese de que o bloqueio adrenérgico local utilizando géis de fentolamina (bloqueador não seletivo  $\alpha$ 1-AR) e propranolol (bloqueador não seletivo  $\beta$ 2-AR) como medicação tópica temporária teria efeitos benéficos na regulação da reabsorção óssea e radicular em incisivos de ratos

reimplantados tardiamente. Para isso, foram realizados três tipos de análises: microtomográfica, histomorfométrica e histoquímica. Métodos histomorfométricos de análise têm sido adotados pela maioria dos estudos *in vivo* e, embora sejam considerados adequados para avaliar o processo de reparo dos tecidos dentais e periodontais, optou-se por sua complementação com a análise microtomográfica devido às limitações dos métodos 2D (Saito et al., 2011; Carvalho et al., 2012; Vilela et al., 2012; Reis et al., 2014; Matos et al., 2016). A microtomografia computadorizada é um método que permite uma varredura volumétrica precisa e representa uma importante ferramenta para avaliação morfométrica (Reis et al., 2014). A análise histoquímica por meio da contagem de células multinucleadas com reação positiva à TRAP foi essencial para demonstrar o efeito dos fármacos e suas diferentes doses sobre a formação e atividade dos osteoclastos, que são células diretamente envolvidas e responsáveis pelo processo de reabsorção da raiz após o reimplante (Tronstad, 1988; Hammarstrom et al., 1989; Shimizu et al., 2011; Rodrigues et al., 2012; Roskamp et al., 2018).

Os resultados deste estudo revelaram que a aplicação tópica de fentolamina e propranolol na dose de 10 µg/mL inibiu parcialmente a atividade osteoclástica, pois foi encontrada menor quantidade de células multinucleadas TRAP-positivas nas amostras que receberam esse tratamento. Esses dados suportam a hipótese de que o uso de bloqueadores adrenérgicos pode influenciar o processo de reparo periodontal de dentes reimplantados, embora evidências histológicas significativas de atividade antirreabsortiva não tenham sido encontradas. O bloqueio dos receptores  $\alpha$ 1-AR e  $\beta$ 2-AR presentes na superfície de osteoblastos é sugerido como o mecanismo pelo qual os fármacos suprimem a osteoclastogênese. Quando bloqueados por via farmacológica, os receptores  $\alpha$ 1-AR e  $\beta$ 2-AR não se ligam aos neurotransmissores adrenérgicos e a expressão de RANKL, o principal indutor da atividade osteoclástica, é conseqüentemente reduzida (Togari, 2002; Breivik et al., 2005; Fonseca et al., 2011; Shimizu et al., 2011; Rodrigues et al., 2012; Lu et al., 2014). No entanto, o delineamento experimental do presente trabalho não permite afirmar que a supressão da osteoclastogênese pelos fármacos foi resultante do bloqueio desses receptores. É preciso esclarecer se o mecanismo pelo qual a aplicação tópica de fentolamina e propranolol influencia a diferenciação de monócitos em osteoclastos é de fato devido ao bloqueio  $\alpha$ 1-AR e  $\beta$ 2-AR ou devido a

um efeito anti-inflamatório geral como, por exemplo, suprimindo a liberação de citocinas inflamatórias.

Embora cães e macacos representem o modelo animal mais apropriado para estudos em traumatologia dental, ratos foram escolhidos como modelo experimental, pois são mais utilizados devido à fácil manipulação e à existência de uma metodologia definida para reproduzir avulsão e reimplante (Andreasen et al., 2011). Além disso, esses animais possuem metabolismo mais acelerado, permitindo observar os mecanismos de reparo em um curto período de tempo (Saito et al., 2011; Carvalho et al., 2012; Vilela et al., 2012). Na presente investigação, os animais foram eutanasiados em 30 dias após o reimplante porque esse período é suficiente para observar os processos inflamatório e de reparo (Carvalho et al., 2012; Vilela et al., 2012; Matos et al., 2016), já que o reparo do ligamento periodontal ocorre entre 2 e 4 semanas após o reimplante (Panzarini et al., 2013). No entanto, a maioria dos estudos experimentais *in vivo* que investigaram o uso de substâncias ou medicações intracanaís no reimplante dentário, tem analisado os parâmetros de reparo periodontal em períodos maiores de observação, geralmente entre 60 e 90 dias (Trevisan et al., 2011; Mori et al., 2013; Panzarini et al., 2014; Esteves et al., 2015; Yoo et al., 2015; Ferreira et al., 2017; Brandini et al., 2018). Assim, a utilização de um único tempo experimental no presente estudo pode ser considerada uma das limitações do trabalho. Além disso, pode-se inferir que a utilização de um período experimental mais curto em relação à maioria dos trabalhos publicados na área de traumatismos dentários pode ter subestimado os efeitos a longo prazo do bloqueio adrenérgico quando comparado a outras formas de tratamento. O potencial antirreabsortivo dos géis de fentolamina e propranolol decorrentes do efeito antiosteoclastogênico observado neste estudo, em especial nas doses de 10 µg/mL, poderia ter sido evidente, histologicamente, em um tempo maior de análise. O tempo experimental de 30 dias talvez não tenha sido suficiente para observar diferenças estatisticamente significantes entre os grupos quanto aos parâmetros histomorfométricos e microtomográficos investigados. Semelhantemente, Yoo et al. (2015) analisaram o efeito do zoledronato, um fármaco da classe dos bifosfonatos, na progressão da reabsorção radicular externa após reimplante em ratos, nos tempos experimentais de 30 e 60 dias, mas só encontraram efeitos significativos do fármaco no período de 60 dias.

O SNAS regula os mecanismos de resposta imune e inflamatória periodontal especialmente via receptores  $\alpha$ 1-AR e  $\beta$ 2-AR (Lu et al., 2014). No entanto, é sabido que outros tipos e subtipos de receptores adrenérgicos estão presentes nas células do ligamento periodontal e que bloqueadores adrenérgicos inespecíficos, como os que foram utilizados neste estudo, podem se ligar a outros subtipos de receptores e, conseqüentemente, diminuir seu mecanismo de ação via  $\alpha$ 1-AR e  $\beta$ 2-AR, mas essa seletividade pode variar dependendo da dose (Bonnet et al., 2008; Lu et al., 2014). A fentolamina liga-se tanto a receptores  $\alpha$ 1-AR e  $\alpha$ 2-AR, enquanto o propranolol se liga a receptores  $\beta$ 1-AR e  $\beta$ 2-AR (Okada et al., 2010; Rodrigues et al., 2012; Lu et al., 2014). Assim, embora estudos anteriores tenham observado efeitos benéficos na doença periodontal com a utilização de fentolamina e propranolol, fármacos de segunda ou terceira geração, que são bloqueadores seletivos  $\alpha$ 1-AR e  $\beta$ 2-AR devem ser considerados em futuros trabalhos. Além disso, é preciso estabelecer a biodisponibilidade dos géis no periodonto para definir a relação entre a concentração liberada e o efeito farmacodinâmico.

De forma geral, podemos dizer que, apesar dos medicamentos utilizados no presente estudo não apresentarem efeitos significativos na redução da reabsorção radicular no período experimental de 30 dias, o bloqueio adrenérgico local representa uma importante via de modulação da atividade clástica e imunopatogênese inflamatória periodontal após replante dentário, pois houve uma redução significativa da osteoclastogênese em amostras tratadas com 10  $\mu$ g/mL dos fármacos. Os achados desse estudo pioneiro com uso de géis de fentolamina e propranolol representam dados preliminares que servirão de base para futuros experimentos *in vitro* e *in vivo*, necessários para demonstrar mais precisamente os benefícios do bloqueio adrenérgico local no processo de reparo de dentes reimplantados.

## REFERÊNCIAS\*

Ahn HJ, Nam OH, Lee HS, Kim EC, Cohenca N, Choi SC. Expression of inflammatory cytokines and MMPs on replanted teeth at different extra-alveolar time: an ex vivo and in vivo study. *Int J Paediatr Dent*. 2016;26(4):301-9. doi: 10.1111/ipd.12211.

Andersson L, Andreasen JO, Day P, Heithersay G, Trope M, DiAngelis AJ, et al. International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2. Avulsion of permanent teeth. *Dent Traumatol*. 2012;28(2):88-96. doi: 10.1111/j.1600-9657.2012.01125.x.

Andersson L, Bodin I. Avulsed human teeth replanted within 15 minutes: a long-term clinical follow-up study. *Endod Dent Traumatol*. 1990;6(1):37-42. PubMed PMID: 2390966.

Andreasen JO, Andersson L. Critical considerations when planning experimental in vivo studies in dental traumatology. *Dent Traumatol*. 2011;27(4):275-80. doi: 10.1111/j.1600-9657.2011.00983.x.

Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 1. Diagnosis of healing complications. *Endod Dent Traumatol*. 1995a;11(2):51-8. PubMed PMID: 7641619.

Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 2. Factors related to pulpal healing. *Endod Dent Traumatol*. 1995b;11(2):59-68. PubMed PMID: 7641620.

Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 4. Factors related to periodontal ligament healing. *Endod Dent Traumatol*. 1995c;11(2):76-89. PubMed PMID: 7641622.

Bastos JV, Côrtes MIS, Silva JF, Goulart EMA, Colosimo EA, Gomez RS, et al. A study of the interleukin-1 gene cluster polymorphisms and inflammatory external root resorption in replanted permanent teeth. *Int Endod J*. 2015;48(9):878-87. doi: 10.1111/iej.12384.

Bastos JV, Silva TA, Colosimo EA, Côrtes MI, Ferreira DA, Goulart EM, et al. Expression of inflammatory cytokines and chemokines in replanted permanent teeth with external root resorption. *J Endod*. 2017;43(2):203-209. doi: 10.1016/j.joen.2016.10.018.

Bonnet N, Benhamou CL, Beaupied H, Laroche N, Vico L, Dolleans E, et al. Doping dose of salbutamol and exercise: deleterious effect on cancellous and cortical bones in adult rats. *J Appl Physiol* (1985). 2007;102(4):1502-9. PubMed PMID: 17185495. doi: 10.1152/jappphysiol.00815.2006.

\* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jan 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Bonnet N, Benhamou CL, Malaval L, Goncalves C, Vico L, Eder V, et al. Low dose beta-blocker prevents ovariectomy-induced bone loss in rats without affecting heart functions. *J Cell Physiol.* 2008;217(3):819-27. doi: 10.1002/jcp.21564.

Brandini DA, Amaral MF, Debortoli CVL, Panzarini SR. Immediate tooth replantation: root canal filling for delayed initiation of endodontic treatment. *Braz Oral Res.* 2018;32:e7. doi: 10.1590/1807-3107/2018.vol32.0007.

Breivik T, Gundersen Y, Opstad PK, Fonnum F. Chemical sympathectomy inhibits periodontal disease in Fischer 344 rats. *J Periodontal Res.* 2005;40(4):325–30. doi: 10.1111/j.1600-0765.2005.00803.x.

Bros F, Wolshin EM. Determination of phentolamine in blood and urine by high performance liquid chromatography. *Anal Chem.* 1978;50(3):521–5. PubMed PMID: 637302.

Carvalho EDS, Costa FTS, Campos MS, Anbinder AL, Neves ACC, Habitante SM, et al. Root surface treatment using diode laser in delayed tooth replantation: radiographic and histomorphometric analyses in rats. *Dent Traumatol.* 2012;28(6):429–36. doi: 10.1111/j.1600-9657.2011.01108.x.

Carvalho EDS, Rosa RH, Pereira FM, Anbinder AL, Mello I, Habitante SM, et al. Effects of diode laser irradiation and fibroblast growth factor on periodontal healing of replanted teeth after extended extra -oral dry time. *Dent Traumatol.* 2017;33(2):91-99. doi: 10.1111/edt.12308.

Carvalho FB, Andrade AS, Barbosa AFS, Aguiar MC, Cangussu MCT, Pinheiro ALB, et al. Evaluation of laser phototherapy (780 nm) after dental replantation in rats. *Dent Traumatol.* 2016;32:488-494. doi: 10.1111/edt.12289.

Consolaro A. The four mechanisms of dental resorption initiation. *Dental Press J Orthod.* 2013;18(3):7–9. PubMed PMID: 24094007.

Diangelis AJ, Andreasen JO, Ebeleseder KA, Kenny DJ, Trope M, Sigurdsson A, et al. International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 1. Fractures and luxations of permanent teeth. *Dent Traumatol.* 2012;28(1):2-12. doi: 10.1111/j.1600-9657.2011.01103.x.

Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell.* 2000;100(2):197-207. PubMed PMID: 10660043.

Eccles JD. The development of the periodontal membrane in the rat incisor. *Arch Oral Biol.* 1964;9(2):127–33.

Eleftheriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, et al. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature.* 2005;434(7032):514-20. PubMed PMID: 15724149.

Esteves JC, Marão HF, Silva PI, Poi WR, Panzarini SR, Aranega AM, et al. Delayed tooth replantation following root canal filling with calcium hydroxide and MTA: histomorphometric study in rats. *Arch Oral Biol.* 2015;60(9):1254-62. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.02.002.

Ferreira MM, Botelho MF, Abrantes M, Carvalho L, Carrilho E. Histologic evaluation of the effect of mineral trioxide aggregate-Fillapex as a root canal sealer in rat teeth submitted to late replantation. *Eur J Dent.* 2017;11(1):89-93. doi: 10.4103/ejd.ejd\_106\_16.

Fonseca TL, Jorgetti V, Costa CC, Capelo LP, Covarrubias AE, Moulatlet AC, et al. Double disruption of alpha2A- and alpha2C-adrenoceptors results in sympathetic hyperactivity and high-bone-mass phenotype. *J Bone Miner Res.* 2011;26(3):591-603. doi: 10.1002/jbmr.243.

Gugler R, Bodem G, Dengler HJ. Pharmacokinetics of beta-receptor-blocking agents in relation to their anti-hypertensive effect. *Clin Sci Mol Med Suppl.* 1976;3:473s-75s. PubMed PMID: 15758.

Hammarstrom L, Blomlof L, Lindskog S. Dynamics of dentoalveolar ankylosis and associated root resorption. *Endod Dent Traumat.* 1989;5:163-75. PubMed PMID: 2517781.

Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature.* 2003;423(6937):349-55. PubMed PMID: 12748654.

Hecova H, Tzigkounakis V, Merglova V, Netolicky J. A retrospective study of 889 injured permanent teeth. *Dent Traumatol.* 2010;26(6):466-75. doi: 10.1111/j.1600-9657.2010.00924.x.

Hiremath G, Kidiyoor KH. Avulsion and storage media. *J Investig Clin Dent.* 2011;2(2):89-94. doi: 10.1111/j.2041-1626.2010.00043.x.

Holan G. Replantation of avulsed primary incisors: a critical review of a controversial treatment. *Dent Traumatol.* 2013;29(3):178-84. doi: 10.1111/edt.12038.

Khinda VI, Kaur G, Brar GS, Kallar S, Khurana H. Clinical and practical implications of storage media used for tooth avulsion. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2017;10(2):158-165. doi: 10.5005/jp-journals-10005-1427.

Lu H, Xu M, Wang F, Liu S, Gu J, Lin S. Chronic stress enhances progression of periodontitis via  $\alpha$ 1-adrenergic signaling: a potential target for periodontal disease therapy. *Exp Mol Med.* 2014;46:e118. doi: 10.1038/emm.2014.65.

Matos FS, Godolphim FJ, Correia AMO, de Albuquerque Júnior RLC, Paranhos LR, Rode SM, et al. Effect of laser photobiomodulation on the periodontal repair process of replanted teeth. *Dent Traumatol.* 2016; 32:402-408. doi: 10.1111/edt.12276.

Mori GG, Janjácómo DMM, Castilho LR, Poi WR. Evaluating the knowledge of sports participants regarding dental emergency procedures. *Dent Traumatol.* 2009;25(3):305–8. doi: 10.1111/j.1600-9657.2009.00786.x.

Mori GG, Poi WR, Castilho LR. Evaluation of the anti-resorptive ability of na experimental acetazolamide paste for the treatment of late replanted teeth: a study in rats. *Dent Traumatol.* 2013;29(1):34–40. doi: 10.1111/j.1600-9657.2012.01131.x.

Mori GG, Turcio KHL, Borro VPB, Mariusso AM. Evaluation of the knowledge of tooth avulsion of school professionals from Adamantina, São Paulo, Brazil. *Dent Traumatol.* 2007;23(1):2–5. doi: 10.1111/j.1600-9657.2005.00391.x.

Najeeb S, Siddiqui F, Khurshid Z, Zohaib S, Zafar MS, Ansari SA. Effect of bisphosphonates on root resorption after tooth replantation - a systematic review. *Dent Traumatol.* 2017;33(2):77 -83. doi: 10.1111/edt.12316.

Okada Y, Hamada N, Kim Y, Takahashi Y, Sasaguri K, Ozono S, et al. Blockade of sympathetic B-receptors inhibits Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss in an experimental rat periodontitis model. *Arch Oral Biol.* 2010;55(7):502–8. doi: 10.1016/j.archoralbio.2010.04.002.

Panzarini SR, Okamoto R, Poi WR, Sonoda CK, Pedrini D, da Silva PE, et al. Histological and immunohistochemical analyses of the chronology of healing process after immediate tooth replantation in incisor rat teeth. *Dent Traumatol.* 2013;29(1):15-22. doi: 10.1111/j.1600-9657.2012.01127.x.

Panzarini SR, Sonoda CK, Saito CT, Hamanaka EF, Poi WR. Delayed tooth replantation: MTA as root canal filling. *Braz Oral Res.* 2014;28:1-7. PubMed PMID: 25337936.

Pasco JA, Henry MJ, Sanders KM, Kotowicz MA, Seeman E, Nicholson GC. Beta-adrenergic blockers reduce the risk of fracture partly by increasing bone mineral density: Geelong Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res.* 2004;19(1):19-24. PubMed PMID: 14753732.

Petrovic B, Marković D, Peric T, Blagojevic D. Factors related to treatment and outcomes of avulsed teeth. *Dent Traumatol.* 2010;26(1):52-9. doi: 10.1111/j.1600-9657.2009.00836.x.

Pierce AM. Experimental basis for the management of dental resorption. *Endod Dent Traumatol.* 1989;5(6):255–65. PMID: 2701095.

Pierroz DD, Bouxsein ML, Rizzoli R, Ferrari SL. Combined treatment with a beta-blocker and intermittent PTH improves bone mass and microarchitecture in ovariectomized mice. *Bone.* 2006;39(2):260-7. doi: 10.1016/j.bone.2006.01.145.

Reis MVP, Moura CC, Soares PB, Leoni GB, Souza-Neto MD, Barbosa DZ, et al. Histologic and micro-computed tomographic analyses of replanted teeth stored in different kind of media. *J Endod.* 2014;40(5):665-9. doi: 10.1016/j.joen.2013.09.023.

Ricieri CB, Sonoda CK, Aranega AM, Panzarini SR, Poi WR, Sundefeld MLMM, et al. Healing process of incisor teeth of diabetic rats replanted after storage in milk. *Dent Traumatol.* 2009;25(3):284–9. doi: 10.1111/j.1600-9657.2009.00767.x.

Rodrigues WF, Madeira MF, da Silva TA, Clemente-Napimoga JT, Miguel CB, Dias-da-Silva VJ, et al. Low dose of propranolol down-modulates bone resorption by inhibiting inflammation and osteoclast differentiation. *Br J Pharmacol.* 2012;165(7):2140-51. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01686.x.

Roskamp L, Trevilatto PC, Souza CM, Silva Neto UX, Carneiro E, Fariniuk LF, et al. Analysis of the association of clinical factors and IL4 gene polymorphisms with root resorption in avulsed teeth after 1 year of replantation. *Int Endod J.* 2018;51(1):12-19. doi: 10.1111/iej.12797.

Saito CTMH, Gulinelli JL, Panzarini SR, Garcia VG, Okamoto R, Okamoto T, et al. Effect of low-level laser therapy on the healing process after tooth replantation: a histomorphometrical and immunohistochemical analysis. *Dent Traumatol.* 2011;27(1):30–9. doi: 10.1111/j.1600-9657.2010.00946.x.

Santos CLV, Sonoda CK, Poi WR, Panzarini SR, Sundefeld MLMM, Negri MR. Delayed replantation of rat teeth after use of reconstituted powdered milk as a storage medium. *Dent Traumatol.* 2009;25(1):51–7. doi: 10.1111/j.1600-9657.2008.00723.x.

Schlienger RG, Kraenzlin ME, Jick SS, Meier CR. Use of beta-blockers and risk of fractures. *JAMA.* 2004;292(11):1326-32. PubMed PMID: 15367554.

Shimizu Y, Hosomichi J, Kaneko S, Shibutani N, Ono T. Effect of sympathetic nervous activity on alveolar bone loss induced by occlusal hypofunction in rats. *Arch Oral Biol.* 2011;56(11):1404-11. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.05.004.

Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell.* 2002;111(3):305-17. PubMed PMID: 12419242.

Takeuchi T, Tsuboi T, Arai M, Togari A. Adrenergic stimulation of osteoclastogenesis mediated by expression of osteoclast differentiation factor in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Biochem Pharmacol.* 2001;61(5):579-86. PubMed PMID: 11239501.

Takka S, Rajbhandari S, Sakr A. Effect of anionic polymers on the release of propranolol hydrochloride from matrix tablets. *Eur J Pharm Biopharm.* 2001;52(1):75-82. PubMed PMID: 11438426.

Togari A, Arai M, Kondo A. The role of the sympathetic nervous system in controlling bone metabolism. *Expert Opin Ther Targets.* 2005;9(5):931-40. PubMed PMID: 16185149.

Togari A. Adrenergic regulation of bone metabolism: possible involvement of sympathetic innervation of osteoblastic and osteoclastic cells. *Microsc Res Tech.* 2002;58(2):77-84. PubMed PMID: 12203706.

Trevisan CL, Panzarini SR, Brandini DA, Poi WR, Luvizuto ER, dos Santos CL, et al. Calcium hydroxide mixed with camphoric p-monochlorophenol or chlorhexidine in delayed tooth replantation. *J Craniofac Surg.* 2011;22(6):2097-101. doi: 10.1097/SCS.0b013e3182326de4.

Tronstad L. Root resorption – etiology, terminology and clinical manifestations. *Endod Dent Traumat.* 1988;4(6):241-52. doi: 10.1111/j.1600-9657.1988.tb00642.x.

Trope M. Avulsion of permanent teeth: theory to practice. *Dent Traumatol.* 2011;27:281-294. doi: 10.1111/j.1600-9657.2011.01003.x.

Trope M. Clinical management of the avulsed tooth: present strategies and future directions. *Dent Traumatol.* 2002;18:1-11. PubMed PMID: 11841460.

Vilela RG, Gjerde K, Frigo L, Leal ECP, Lopes -Martins RAB, Kleine BM, et al. Histomorphometric analysis of inflammatory response and necrosis in re-implanted central incisor of rats treated with low -level laser therapy. *Lasers Med Sci.* 2012;27(3):551–7. doi: 10.1007/s10103-011-0937-7.

Wiens M, Etminan M, Gill SS, Takkouche B. Effects of antihypertensive drug treatments on fracture outcomes: a meta-analysis of observational studies. *J Intern Med.* 2006;260(4):350-62. PubMed PMID: 16961672.

Wimolsantirungsri N, Makeudom A, Louwakul P, Sastraruji T, Chailertvanitkul P, Supanchart C, et al. Inhibitory effect of Thai propolis on human osteoclastogenesis. *Dent Traumatol.* 2018. doi: 10.1111/edt.12401.

Yoo JE, Kim MS, Kwon YD, Kim EC, Kim KC, Choi SC. Could zoledronic acid prevent root resorption in replanted rat molar? *Dent Traumatol.* 2015;31(6):465-70. doi: 10.1111/edt.12202.

## APÊNDICE A – Detalhamento da metodologia

### Tipo de estudo

A pesquisa foi desenvolvida no modelo de estudo experimental *in vitro* (cultura de fibroblastos humanos) e *in vivo* (ratos Wistar), analítico intervencional, randomizado e controlado, com cegamento simples e fatorial (bloqueadores  $\alpha$ -adrenérgico/fentolamina e  $\beta$ -adrenérgico/propranolol).

### Variáveis

O estudo *in vitro* apresenta duas variáveis independentes: fármacos bloqueadores adrenérgicos e doses. A variável dependente é o nível de viabilidade celular. O estudo *in vivo* possui duas variáveis independentes: medicação tópica a base de fentolamina, propranolol ou hidróxido de cálcio, e doses. As variáveis dependentes correspondem ao volume, superfície, proporção e densidade de tecido mineralizado calculados por microtomografia computadorizada; à intensidade de ocorrência de reabsorção radicular, anquilose e reparo periodontal obtidos da análise histomorfométrica; e à atividade osteoclástica.

### Local da pesquisa

Os testes *in vitro* foram realizados no Laboratório de Cultura de Células do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos (ICT-UNESP). Os procedimentos experimentais *in vivo* foram executados no Biotério do ICT-UNESP, e o processamento e análise histológicos no Laboratório de Patologia da mesma Instituição.

## **Aspectos éticos**

O protocolo de pesquisa *in vitro* em cultura de fibroblastos humanos foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos (ICT-UNESP) (ANEXO B), com parecer de número 1.450.087 (CAAE: 51548015.4.0000.0077). O protocolo de estudo *in vivo* foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos (ICT-UNESP) (ANEXO C), sob o registro de número 001/2016, assegurando que todos os princípios legais e éticos da experimentação animal foram seguidos, conforme disposto na Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e nas Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

## **Estudo *in vitro***

### **Amostra**

O estudo *in vitro* utilizou fibroblastos do ligamento periodontal humano (HPDFLs) de sétima passagem, obtidos do banco de células do Laboratório de Cultura de Células do ICT-UNESP para avaliar qualitativamente o efeito de fármacos bloqueadores adrenérgicos sobre a viabilidade celular. Toda a metodologia da pesquisa *in vitro* foi realizada de acordo com as normas da *International Organization of Standardization* (ISO) 10993-5:2009, organização que padroniza os testes de citotoxicidade. Os procedimentos que necessitavam de ambiente estéril foram executados dentro da câmara de fluxo laminar.

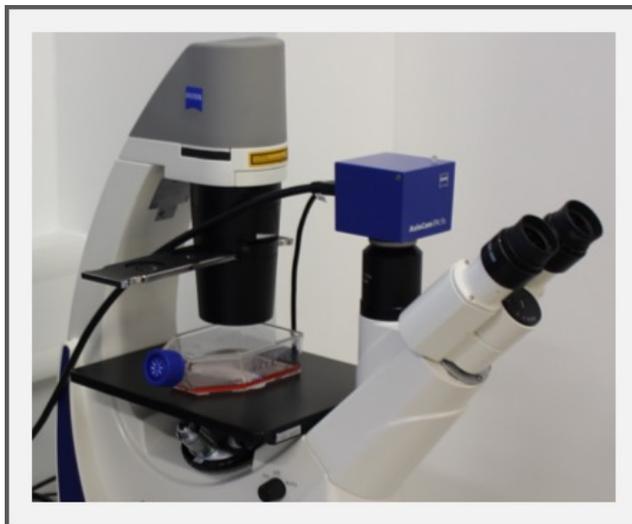
## **Descongelamento das células**

HPDFLs armazenados em criotubos em nitrogênio líquido foram descongelados a 37° C utilizando meio de cultura completo DMEM (Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab Ltda., Campinas, SP, Brasil) e 1% de penicilina (5000 U/mL) mais estreptomicina (5 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em frasco de cultura de células de 75 cm<sup>2</sup> (250 mL). As células contidas no frasco de cultura foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37° C, com atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico.

## **Cultivo das células**

Os fibroblastos foram cultivados em estufa de CO<sub>2</sub> e, a cada 48 horas, o meio de cultura foi renovado. O monitoramento diário do crescimento das células foi realizado utilizando-se um microscópio de fase invertido por meio do qual se observou a morfologia e o comportamento dos fibroblastos (aderência e proliferação) (Figura 1). Após a confirmação no microscópio de 80% de confluência (porcentagem de células que proliferaram na base do frasco de cultura), foi iniciado o subcultivo das células através de passagens consecutivas em frascos de cultura. Em cada passagem, as células aderidas foram desprendidas da garrafa de cultura por digestão enzimática utilizando 5 mL de tripsina a 0,25% e levando todo o conjunto à estufa de CO<sub>2</sub> por 5 minutos. Uma vez observado o desprendimento das células em microscópio de fase invertido, inativou-se a tripsina com a adição de 10 mL de meio de cultura DMEM suplementado. As células em suspensão foram transferidas para um tubo estéril tipo Falcon de 15 mL e centrifugadas a uma temperatura de 4° C, em 2000 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e os precipitados de células (*pellets*) foram ressuspensos em 2 mL de meio de cultura DMEM suplementado.

Figura 1 – Microscópio de fase invertido

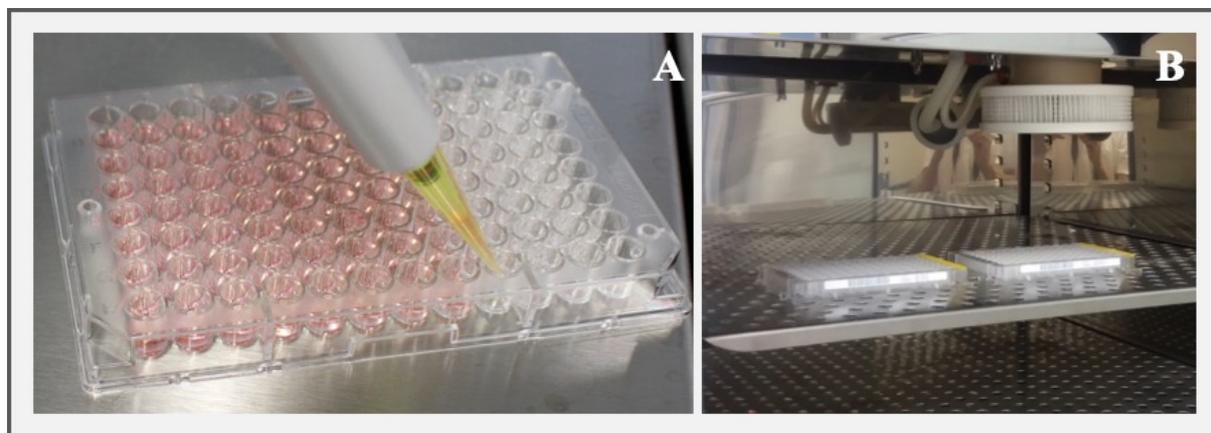


Fonte: Elaborada pelo autor.

## Plaqueamento

As células ressuspensas foram contadas em contador de células automatizado (Tali™ Image-Based Cytometer, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para a determinação do número de células existentes no frasco, a fim de realizar a diluição necessária para o plaqueamento em placa de cultura de 96 poços com fundo chato na densidade de  $8 \times 10^3$  células/poço (Figura 2 A). Após o plaqueamento, 200  $\mu$ L de DMEM suplementado foram adicionados em cada poço e a placa foi incubada em estufa de CO<sub>2</sub> durante 24 horas (Figura 2 B). Em seguida, o meio de cultura foi removido de cada poço e substituído por 200  $\mu$ L de meio DMEM puro ou com doses pré-determinadas dos fármacos bloqueadores adrenérgicos ou do solvente etanol, de acordo com os grupos experimentais descritos a seguir.

Figura 2 – Plaqueamento e incubação



Legenda: A) plaqueamento celular em placa de cultura de 96 poços na densidade de  $8 \times 10^3$  células/poço; B) incubação da placa em estufa de  $\text{CO}_2$ .

Fonte: Elaborada pelo autor.

### Grupos experimentais

Os fármacos bloqueadores adrenérgicos utilizados para a análise de viabilidade celular nesta pesquisa foram a fentolamina (Phentolamine hydrochloride, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e o propranolol (Propranolol hydrochloride, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) (Figura 3). Ambos foram dissolvidos em álcool etílico absoluto na proporção de 10 mg/mL, de acordo com as recomendações do fabricante. As soluções etanólicas dos fármacos foram submetidas à diluição seriada com meio de cultura DMEM para compor os grupos experimentais de acordo com as doses estabelecidas para o preparo das medicações tópicas do estudo *in vivo*: fentolamina (F) 0,75  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$  e 100  $\mu\text{g/mL}$ ; e propranolol (P) 2,5  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$  e 100  $\mu\text{g/mL}$ .

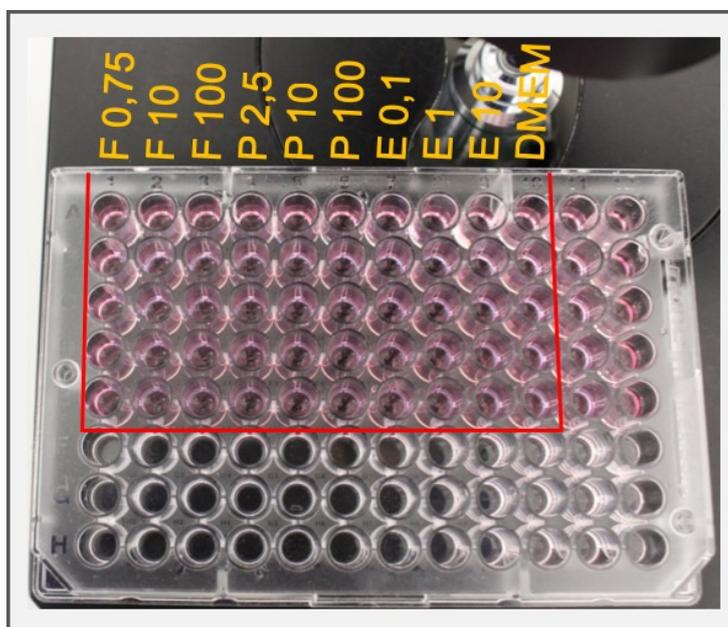
Figura 3 – Fármacos bloqueadores adrenérgicos



Legenda: A) fentolamina; B) propranolol.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

As doses baixas dos fármacos foram determinadas com base na concentração plasmática terapêutica mínima da fentolamina (15 ng/mL) e do propranolol (50 ng/mL) e na porcentagem de liberação do fármaco pelo gel de carboximetilcelulose (CMC) a 2% (Farmácia de Manipulação Terapêutica, São José dos Campos, SP, Brasil) (Gugler et al., 1976; Bros, Wolshin, 1978; Takka et al., 2001). Doses de 10 µg/mL e 100 µg/mL foram definidas como doses intermediárias e altas, equivalentes para ambos os fármacos, aproximadamente 10 e 100 vezes mais concentradas do que a menor dose dos fármacos (0,75 µg/mL). Como controle negativo, foi utilizado o álcool etílico absoluto (E) diluído em meio de cultura DMEM, com base no volume calculado para cada dose dos fármacos (0,1 µL/mL, 1 µL/mL e 10 µL/mL). Como controle positivo, foi utilizado meio de cultura suplementado puro (DMEM). Para cada grupo, foram utilizados cinco poços da placa de 96 poços (Figura 4).

Figura 4 – Grupos experimentais



Fonte: Elaborada pelo autor.

### **Análise qualitativa da viabilidade celular**

A placa de 96 poços contendo HPDFs expostos às soluções dos fármacos, etanol e DMEM, de acordo com os respectivos grupos experimentais, foi mantida em estufa de CO<sub>2</sub> a 37° C por 24 horas. Após esse período, imagens microscópicas dos poços foram obtidas para avaliar a viabilidade celular. Doses dos fármacos e de etanol cujos poços apresentaram confluência ou distribuição celular desigual em relação ao grupo DMEM (controle positivo) foram consideradas citotóxicas.

### **Estudo *in vivo***

### **Amostra**

Foram utilizados 48 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus* (linhagem Wistar), provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, com idade aproximada de dois meses, pesando entre 200 e 250 g. O tamanho da amostra foi calculado com base nos dados preliminares de um estudo piloto usando o software G\*Power. Considerando um limite de equivalência de 20% encontrado por Carvalho et al. (2016), até o qual não se detectou diferença estatística significativa entre os grupos, nível de significância de 5% e poder beta de 80%, um total de 6 animais por grupo foi indicado como o tamanho ideal.

### **Condições locais e de acomodação**

Os animais foram alojados no biotério do ICT-UNESP, em gaiolas coletivas retangulares de dimensões 49x34x16 cm (comprimento x largura x altura), com até cinco animais em cada, em temperatura ambiente e ciclo claro-escuro de 12 horas. As gaiolas eram forradas com maravalha, sendo trocadas diariamente, e os animais foram alimentados com ração e água *ad libitum*.

### **Grupos**

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em oito grupos, cada grupo composto por 06 animais, de acordo com a medicação tópica aplicada no canal radicular, na superfície radicular e no interior do alvéolo antes do reimplante, ou apenas no canal radicular para o grupo HC, conforme descrito no quadro 1. A distribuição randomizada dos animais em seus respectivos grupos foi realizada através da seleção de um envelope lacrado, opaco e numerado de 1 a 48. Para cada numeração existia um código correspondente ao grupo (HC, F0.75, F10, F100, P2.5, P10, P100 ou CMC). Os números foram ordenados aleatoriamente nos respectivos grupos através do gerador de sequência RANDOM.ORG ([www.random.org](http://www.random.org)). Os primeiros 6 números foram alocados para o grupo HC, em

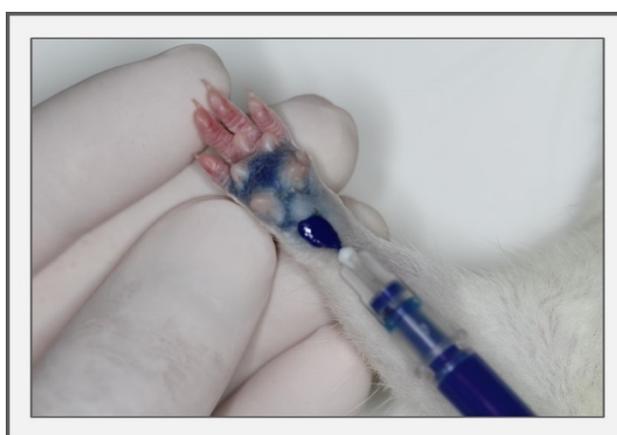
seguida para os grupos F0.75, F10, F100, P2.5, P10, P100 e CMC, sucessivamente. Cada rato foi identificado na pata com tinta Nankin (Acrilex®, São Bernardo do Campo, SP, Brasil) utilizando seringa e agulha estéreis descartáveis para insulina (Saldanha Rodrigues Ltda., Manaus, AM, Brasil) (Figura 5), de acordo com o padrão descrito na figura 6, sendo que para cada padrão existia um código numérico de 1 a 48, equivalente ao grupo especificado no respectivo envelope.

Quadro 1 – Grupos de estudo

Grupos	Medicação Tópica	n
HC	Hidróxido de cálcio P.A. 1 g/mL + Solução fisiológica	06
F0.75	Fentolamina 0,75 µg/mL + Carboximetilcelulose	06
F10	Fentolamina 10 µg/mL + Carboximetilcelulose	06
F100	Fentolamina 100 µg/mL + Carboximetilcelulose	06
P2.5	Propranolol 2,5 µg/mL + Carboximetilcelulose	06
P10	Propranolol 10 µg/mL + Carboximetilcelulose	06
P100	Propranolol 100 µg/mL + Carboximetilcelulose	06
CMC	Carboximetilcelulose	06

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 5 – Identificação dos animais com tinta Nankin



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 6 – Padrão de marcação dos ratos com tinta Nankin

COR	RATO / PADRÃO	COR	RATO / PADRÃO
<b>Amarelo</b>	1 – pata dianteira direita	<b>Marrom</b>	25 – pata dianteira direita
	2 – pata dianteira esquerda		26 – pata dianteira esquerda
	3 – pata traseira direita		27 – pata traseira direita
	4 – pata traseira esquerda		28 – pata traseira esquerda
	5 – duas patas dianteiras		29 – duas patas dianteiras
	6 – duas patas traseiras		30 – duas patas traseiras
<b>Azul</b>	7 – pata dianteira direita	<b>Preta</b>	31 – pata dianteira direita
	8 – pata dianteira esquerda		32 – pata dianteira esquerda
	9 – pata traseira direita		33 – pata traseira direita
	10 – pata traseira esquerda		34 – pata traseira esquerda
	11 – duas patas dianteiras		35 – duas patas dianteiras
	12 – duas patas traseiras		36 – duas patas traseiras
<b>Branca</b>	13 – pata dianteira direita	<b>Verde</b>	37 – pata dianteira direita
	14 – pata dianteira esquerda		38 – pata dianteira esquerda
	15 – pata traseira direita		39 – pata traseira direita
	16 – pata traseira esquerda		40 – pata traseira esquerda
	17 – duas patas dianteiras		41 – duas patas dianteiras
	18 – duas patas traseiras		42 – duas patas traseiras
<b>Cinza</b>	19 – pata dianteira direita	<b>Vermelha</b>	43 – pata dianteira direita
	20 – pata dianteira esquerda		44 – pata dianteira esquerda
	21 – pata traseira direita		45 – pata traseira direita
	22 – pata traseira esquerda		46 – pata traseira esquerda
	23 – duas patas dianteiras		47 – duas patas dianteiras
	24 – duas patas traseiras		48 – duas patas traseiras

Fonte: Elaborada pelo autor.

## Procedimento cirúrgico

Os procedimentos de exodontia e reimplante dentário foram realizados utilizando instrumental cirúrgico esterilizado em autoclave. O cirurgião e auxiliares utilizaram equipamentos de proteção individual, respeitando todos os princípios de biossegurança.

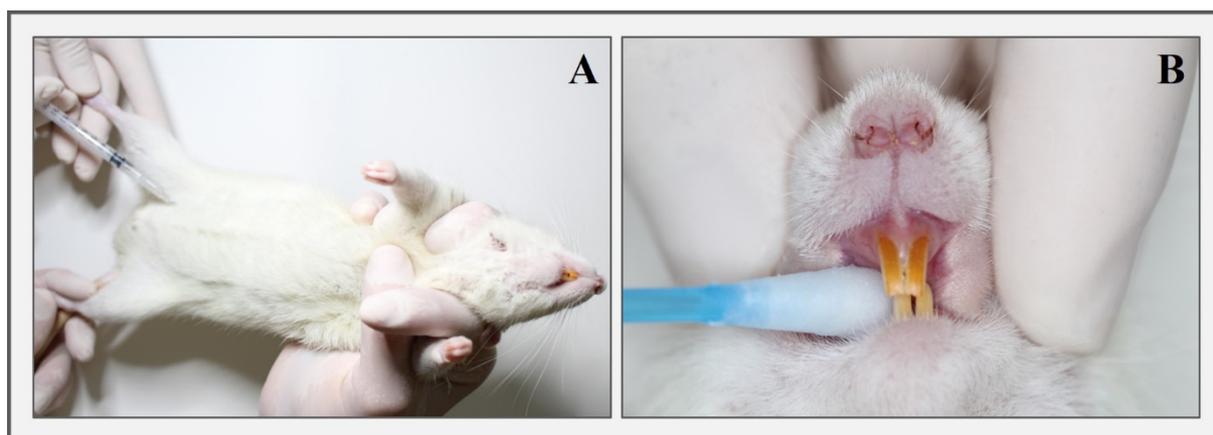
## Extração dos incisivos

Os animais foram submetidos à anestesia geral com injeção intraperitoneal de uma mistura de Cloridrato de Cetamina 10% (Dopalen®, Agribrands do Brasil

Ltda., Paulínia, SP, Brasil) e Cloridrato de Xilazina 2% (Anasedan<sup>®</sup>, Rompun-Bayer, São Paulo, SP, Brasil), na proporção de 0,75/0,5 mL e em uma dose de 0,1 mL por 100 g de peso corporal, utilizando seringa e agulha estéreis descartáveis para insulina (Figura 7 A).

Logo após, foram posicionados em decúbito dorsal para realização da antisepsia intraoral da porção anterior da maxila com Gluconato de Clorexidina a 0,12% (Colgate-Palmolive Industrial Ltda., São Bernardo do Campo, SP, Brasil), utilizando uma haste flexível com ponta de algodão esterilizada (Johnson & Johnson Industrial Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil) (Figura 7 B).

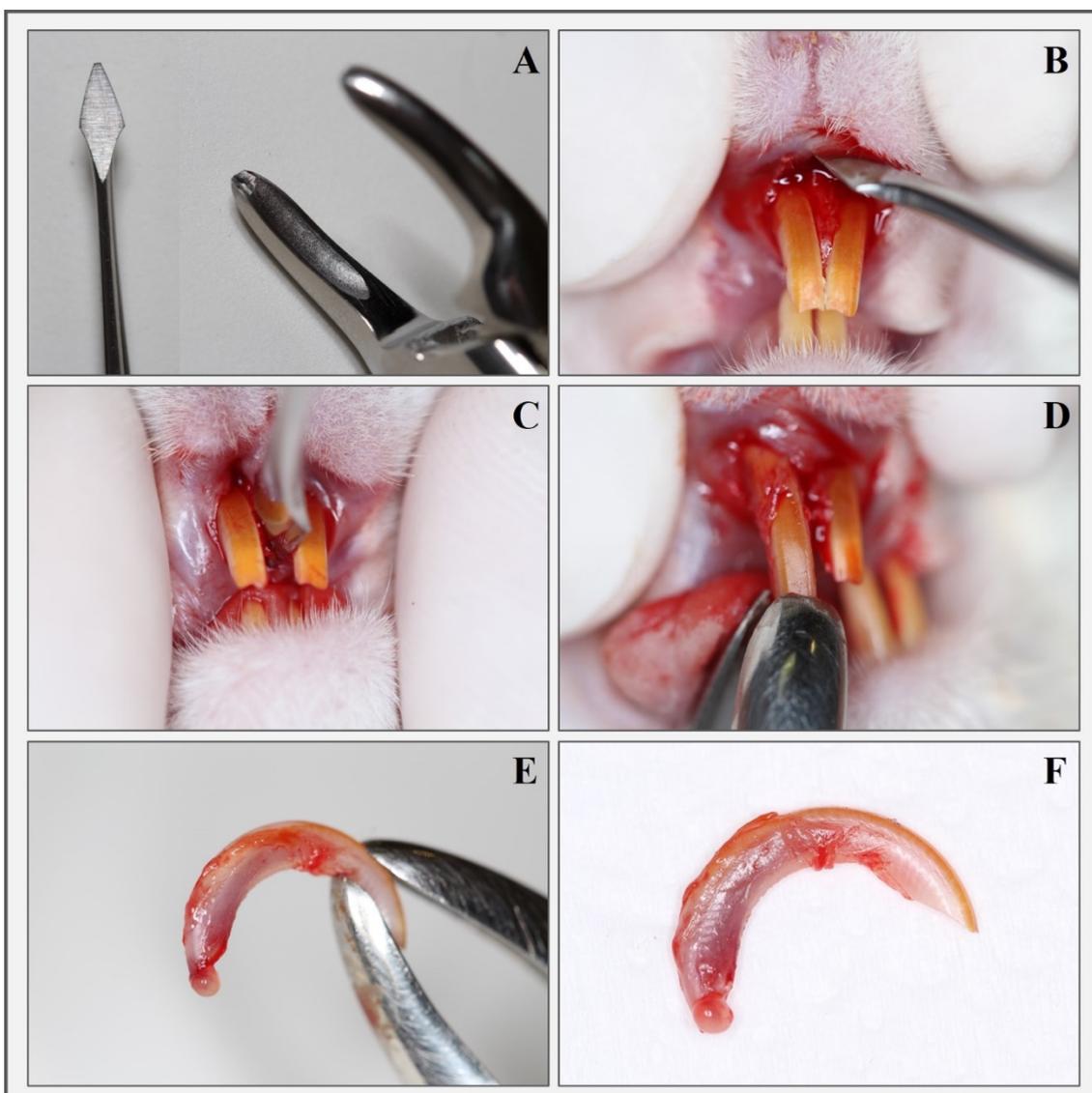
Figura 7 – Procedimentos pré-cirúrgicos



Legenda: A) anestesia geral; B) antisepsia.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

A sindesmotomia, luxação e extração do incisivo superior direito de cada rato foram realizadas utilizando um descolador de Buser (Trinity Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e um fórceps de número 150 adulto adaptado (Golgran Ind. Com. Instr. Odontológico Ltda., São Caetano do Sul, SP, Brasil), no qual foi confeccionado um sulco na sua parte ativa para melhor apreensão da coroa do incisivo do rato (Figura 8) (Matos et al., 2016).

Figura 8 – Procedimentos cirúrgicos



Legenda: A) instrumentos utilizados para sindesmotomia, luxação e extração; B) sindesmotomia; C) luxação do incisivo superior direito; D) extração do incisivo superior direito; E) incisivo apreendido com fórceps; F) incisivo extraído.

Fonte: Elaborada pelo autor.

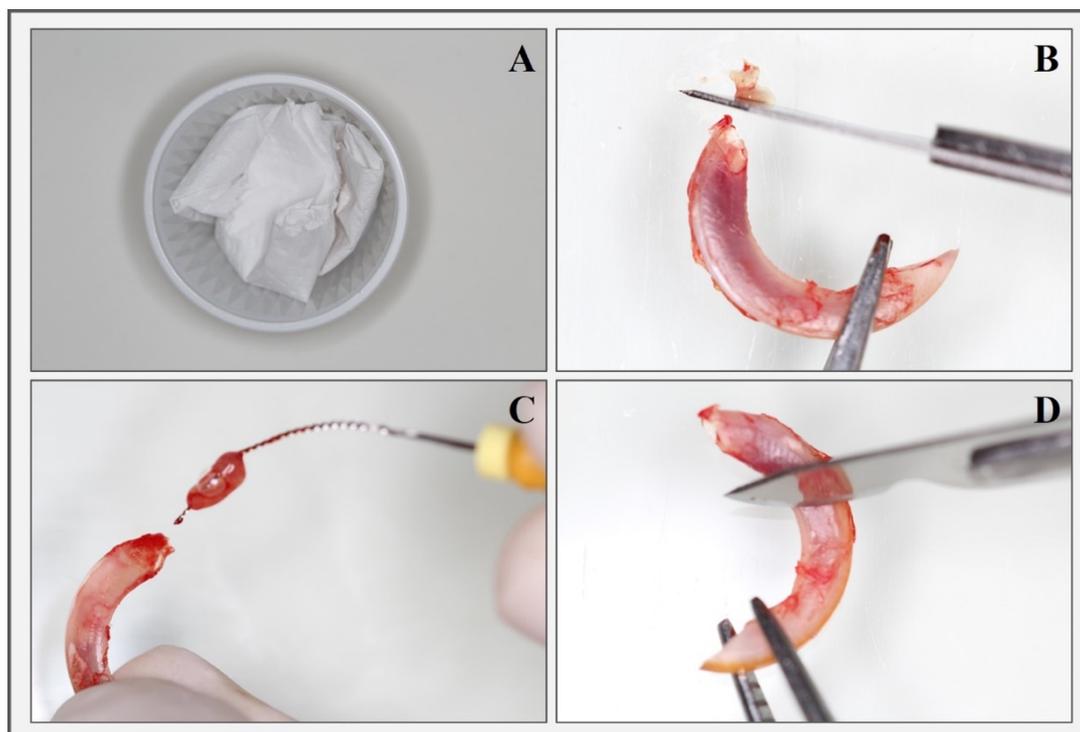
### Tratamento dos incisivos pós-exodontia

Após a exodontia, os dentes foram armazenados em guardanapo de papel (Santher®, Fábrica de Papel Santa Therezinha S.A., Bragança Paulista, SP, Brasil), em temperatura ambiente, por um período de 30 minutos (Mori et al., 2013) (Figura 9

A), para simular as condições em que os dentes chegam aos consultórios, em casos de reimplantes tardios (Mori et al., 2007, 2009; Hiremath, Kidiyoor, 2011; Matos et al., 2016).

Com o objetivo de controlar o crescimento contínuo do incisivo dos ratos e a necrose do tecido pulpar posterior à extração, decorridos 30 minutos, a papila dental de cada dente extraído foi removida com lâmina de bisturi número 15 (Suzhou Kyuan Medical Apparatus Co. Ltda., Beiqiao Town, Suzhou City, China) (Figura 9 B) e a polpa extirpada via forame apical com auxílio de uma lima Hedstroem número 20 de 25 mm pré-curvada (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) (Figura 9 C). Após isso, o ligamento periodontal também foi removido por raspagem com lâmina de bisturi nº 15 (Figura 9 D).

Figura 9 – Tratamento dos incisivos pós-exodontia



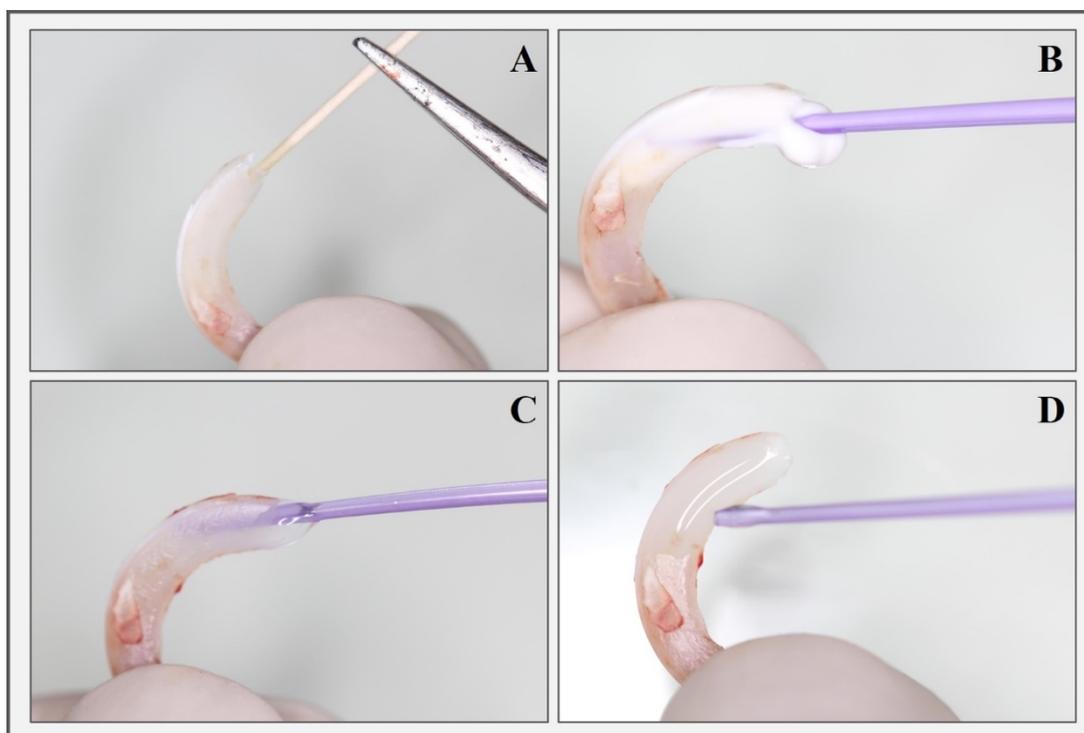
Legenda: A) incisivo superior direito armazenado em guardanapo de papel; B) remoção da papila dental; C) extirpação da polpa via forame apical; D) remoção do ligamento periodontal.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

## **Aplicação da medicação tópica**

Subsequentemente, os canais radiculares e a superfície radicular externa foram irrigados com 5 mL de solução fisiológica em cada (Farmax, Divinópolis, MG, Brasil), utilizando seringa e agulha estéreis descartáveis de 5 mL (Becton Dickinson Ind. Cirúr. Ltda., Curitiba, PR, Brasil). Em seguida, os canais foram secos com pontas de papel absorvente esterilizadas de número 20 (Dentsply Ind. e Com. Ltda., Petrópolis, RJ, Brasil) (Figura 10 A).

No grupo HC, foi aplicada no interior do canal radicular pasta de hidróxido de cálcio P.A. com soro fisiológico, na proporção 1:1, com auxílio de pontas Capillary Tip 0.014" de 25 mm (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) e seringas estéreis descartáveis de 1,2 mL (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) (Figura 10 B). Nos demais grupos, foram aplicados 15 µL de géis de fentolamina (F), propranolol (P) ou carboximetilcelulose 2% (CMC) (Farmácia de Manipulação Terapêutica, São José dos Campos, SP, Brasil), em suas respectivas doses (Quadro 1), no canal radicular e na superfície radicular, como descrito anteriormente (Figura 10 C e D). O tempo médio para a realização desses procedimentos foi de 1 minuto.

Figura 10 – Aplicação da medicação tópica



Legenda: A) secagem do canal radicular; B) preenchimento do canal radicular com pasta de hidróxido de cálcio; C) preenchimento do canal radicular com gel de F/P/CMC; D) aplicação de gel de F/P/CMC na superfície radicular.

Fonte: Elaborada pelo autor.

## Reimplante dental

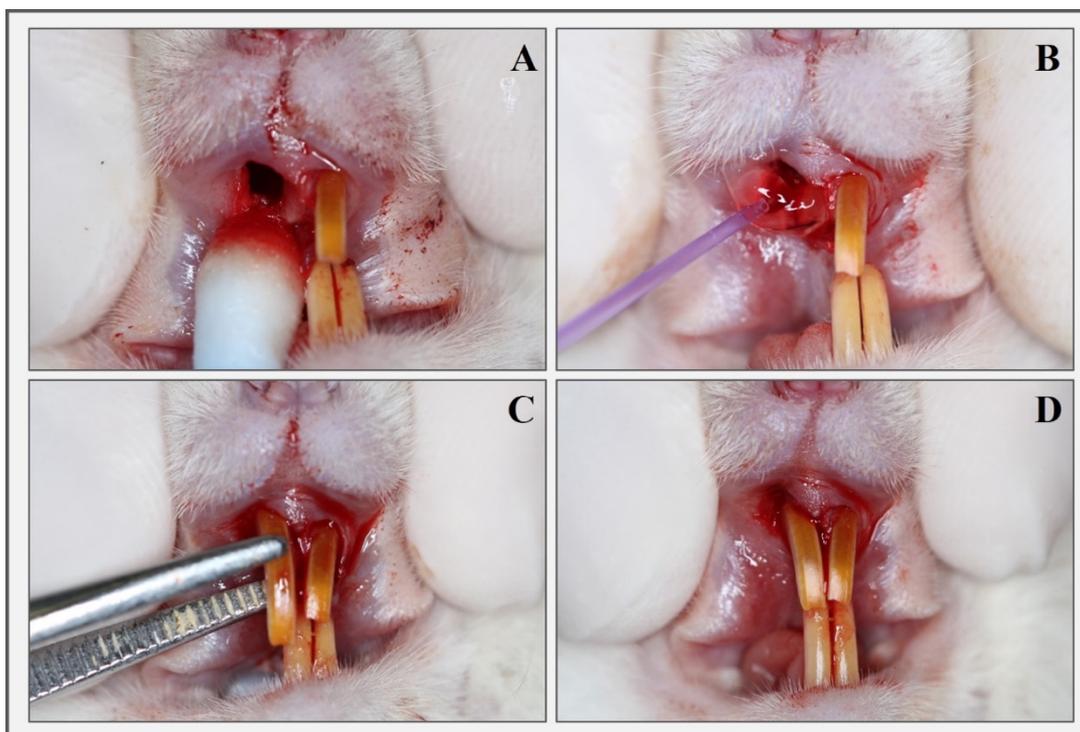
Previamente ao reimplante dos dentes em seus alvéolos, realizou-se uma nova antissepsia da região anterior da maxila com Gluconato de Clorexidina a 0,12% (Figura 11 A) e lavagem do alvéolo com 2 mL de solução fisiológica, utilizando seringa e agulha estéreis descartáveis de 5 mL, para a remoção do coágulo. Após aspiração da solução fisiológica, o alvéolo foi preenchido com 15  $\mu$ L da medicação tópica correspondente ao grupo, com exceção do grupo HC que só recebeu medicação intracanal (Figura 11 B).

O reimplante dental foi realizado com auxílio de uma pinça clínica, em movimento lento e delicado, verificando o correto posicionamento do dente no interior do alvéolo (Figura 11 C). Após o reimplante, nenhuma contenção foi

realizada, uma vez que a própria conformação anatômica do dente e de seu alvéolo é suficiente para mantê-lo em sua posição original (Figura 11 D) (Santos et al., 2009; Ricieri et al., 2009; Matos et al., 2016).

Os animais receberam dose única intramuscular de uma associação antibiótica (Megacilin Super Plus, Vansil Ind. Com. e Repr. Ltda., Descalvado, SP, Brasil) diluída em 15 mL de água para injeção estéril (Samtec Biotecnologia, Ribeirão Preto, SP, Brasil), na posologia de 0,005 mL/100 g, de acordo com a recomendação do fabricante, utilizando seringa para insulina e agulha hipodérmica estéreis descartáveis. Nas primeiras 12 horas pós-reimplante, os animais receberam apenas água; depois, foram alimentados com ração triturada até completar 72 horas, quando então a alimentação voltou ao normal.

Figura 11 – Reimplante dental

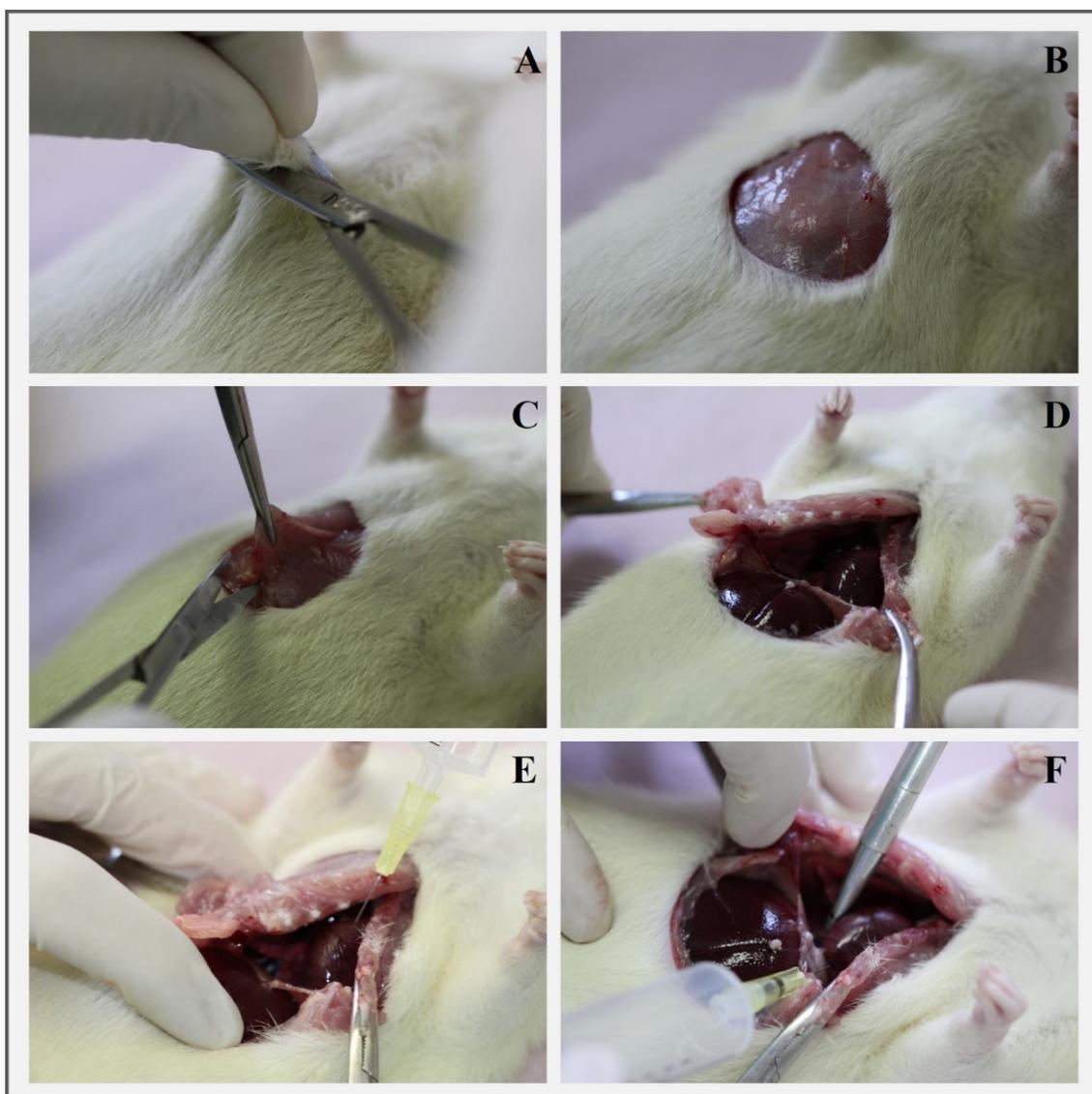


Legenda: A) antissepsia da região anterior da maxila previamente ao reimplante; B) aplicação de gel de F/P/CMC no alvéolo; C) reimplante dental. D) incisivo superior direito reimplantado.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

## **Eutanásia e obtenção das peças cirúrgicas**

Trinta dias após o reimplante, todos os animais foram anestesiados e eutanasiados por perfusão transcardíaca com formaldeído a 10% e decapitação em guilhotina, seguindo as diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA. Para a realização da perfusão transcardíaca, os animais foram posicionados em decúbito dorsal e foi feito um retalho na região do tórax para dissecação e exposição da cavidade torácica (Figura 12 A a D). Em seguida, foi feita uma incisão no átrio direito do animal (Figura 12 E) e imediatamente foram injetados 20 mL de soro fisiológico no ventrículo esquerdo, mantendo a pressão arterial e os batimentos cardíacos, até que todo o sangue circulante fosse aspirando através da incisão no átrio direito. Observada a translucidez da solução drenada pela incisão do átrio direito, foram injetados 20 mL de solução de formaldeído a 10% no mesmo ponto de perfuração no ventrículo esquerdo, até que toda a mucosa do animal se tornasse pálida (Figura 12 F).

Figura 12 – Perfusão transcardíaca com formol



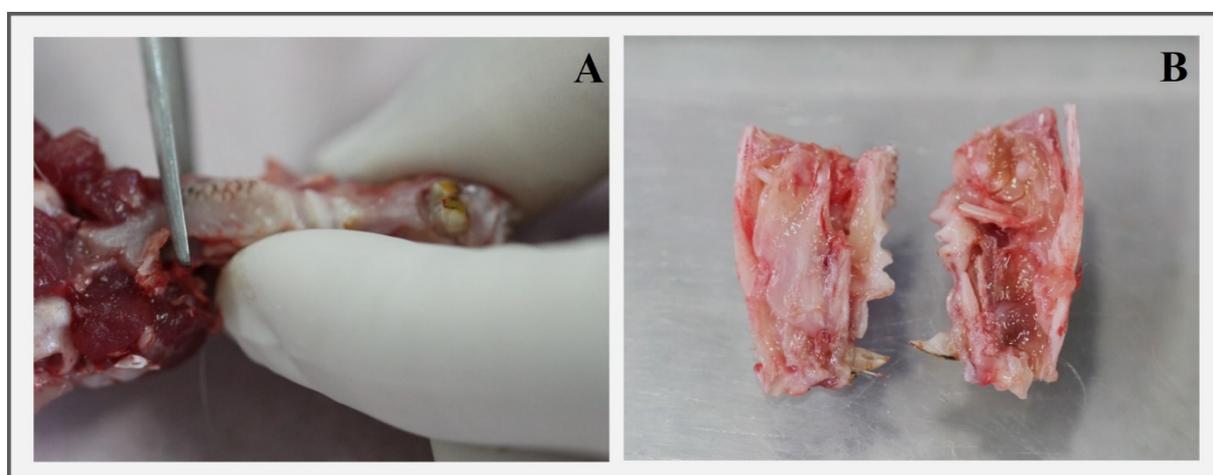
Legenda: A) incisão cutânea na região torácica; B) exposição do tecido subcutâneo; C) confecção de retalho para exposição da cavidade torácica; D) cavidade torácica exposta; E) incisão no átrio direito; F) injeção de soro fisiológico e formaldeído a 10% no ventrículo esquerdo com aspiração sanguínea através da incisão no átrio direito.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a decaptação em guilhotina, a maxila foi dissecada utilizando uma lâmina de bisturi número 15 e sua porção anterior foi removida por meio de um corte com uma tesoura de Metzembaun reta (Golgran Ind. Com. Instr. Odontológico Ltda., São Paulo, SP, Brasil) tangenciando a face distal dos segundos molares superiores (Figura 13 A). A hemimaxila direita, incluindo o incisivo reimplantado, foi então

separada da esquerda na linha mediana com o emprego de uma lâmina de bisturi número 20 (Suzhou Kyuan Medical Apparatus Co. Ltda., Beiqiao Town, Suzhou City, China) (Figura 13 B). As peças foram armazenadas em frascos coletores individuais identificados com o número do animal e contendo 50 mL de solução de formaldeído a 10% para a fixação, por no mínimo 48 horas, em temperatura ambiente. Após esse período, as hemimaxilas direitas foram submetidas à análise microtomográfica.

Figura 13 – Obtenção das peças cirúrgicas



Legenda: A) corte da porção anterior da maxila com tesoura de Metzembraun reta; B) hemimaxilas separadas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

### **Análise por microtomografia computadorizada ( $\mu$ CT)**

O escaneamento das peças para análise por  $\mu$ CT foi realizado no Laboratório de Microtomografia *in vivo* da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, utilizando o microtomógrafo *in vivo* SkyScan 1176 (Bruker microCT, Kontich, Bélgica) (Figura 14). As imagens de cada peça foram reconstruídas e avaliadas com uso dos softwares NRecon (versão 1.6.9.8, SkyScan, Bruker microCT) e CT-Analyzer – CTAn (versão 1.13.11.0, SkyScan, Bruker microCT), respectivamente. O volume, a superfície, a proporção e a densidade de tecido

mineralizado no terço médio da raiz e osso alveolar adjacente foram utilizados como parâmetros para análise do processo de reparo.

Figura 14 – Microtomógrafo *in vivo* SkyScan 1176 (FOAr-UNESP)

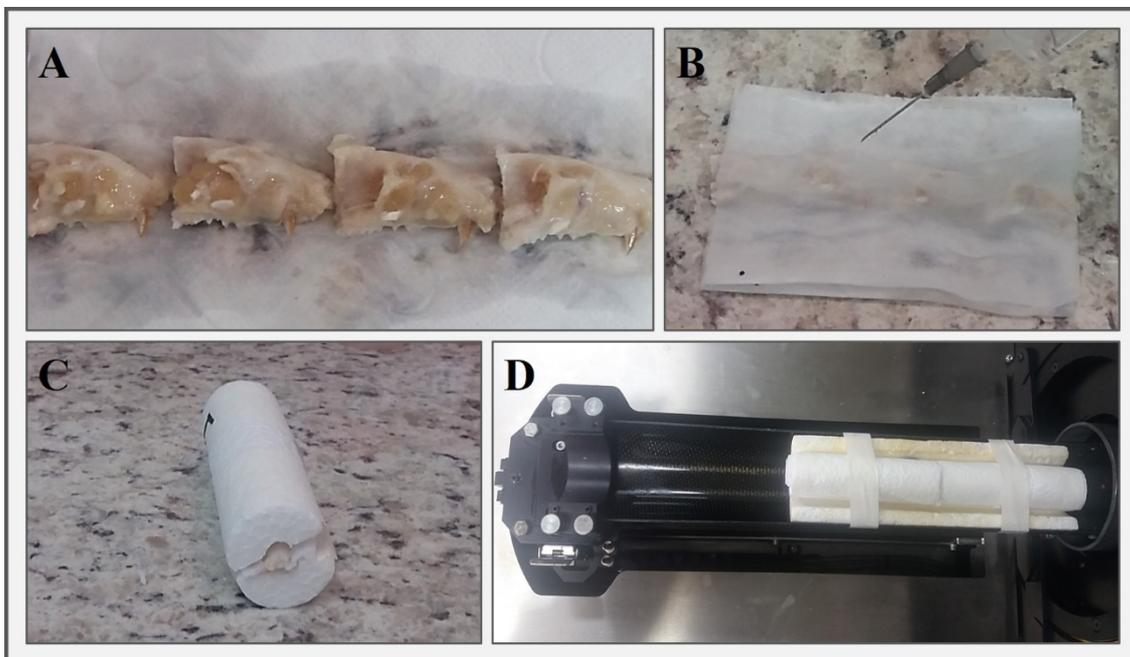


Fonte: <http://www.skyscan.be/products/1176.htm>.

A análise das peças por  $\mu$ CT compreendeu as seguintes etapas:

- a) Escaneamento das peças em um ângulo de rotação de  $180^\circ$ , com passos de rotação de  $0,5^\circ$  e resolução espacial de  $9 \mu\text{m}$ . Para isso, as peças foram envoltas por papel absorvente úmido e montadas em dispositivo específico para estabilização e posicionamento adequado no interior do microtomógrafo (Figura 15).

Figura 15 – Preparo e posicionamento das peças para escaneamento em microtomógrafo

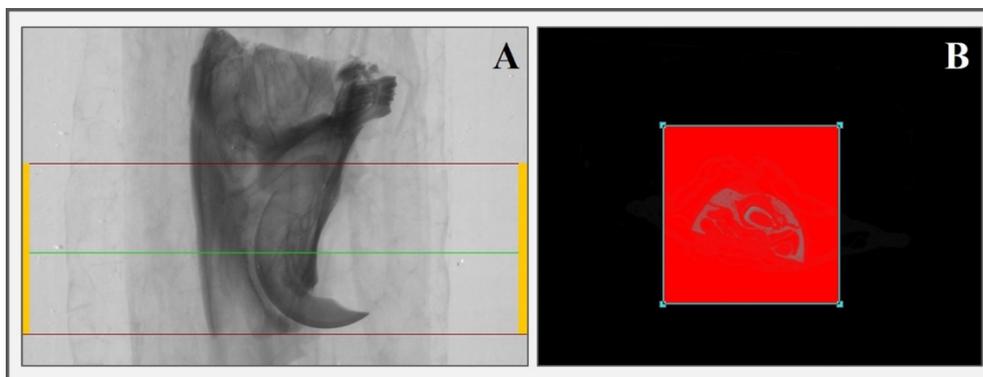


Legenda: A) peças posicionadas sobre papel absorvente; B) envoltas em papel absorvente úmido; C) montadas em dispositivo específico; D) dispositivo com as peças posicionado no interior do microtomógrafo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

- b) Reconstrução bidimensional das imagens das secções transversais de cada peça a partir do ápice radicular até a coroa dental, incluindo o osso alveolar, utilizando o software NRecon (Figura 16).

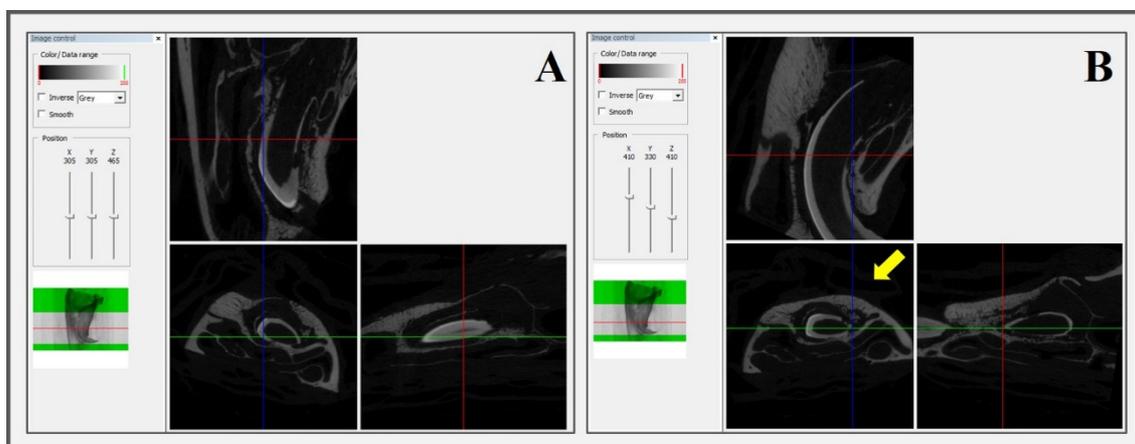
Figura 16 – Reconstrução bidimensional



Legenda: A) delimitação e enquadramento da área de reconstrução e B) região de interesse (ROI).  
Fonte: Elaborada pelo autor.

- c) Ajuste das imagens e escolha do plano de interesse utilizando o software Data Viewer (versão 1.5.0.2, SkyScan, Bruker microCT). Os eixos sagital, transaxial e coronal foram ajustados de forma que as linhas tangenciassem o espaço do ligamento periodontal no terço médio da face palatina da raiz (ROI). Após alinhamento dos três eixos, o plano transaxial foi o escolhido para realizar a medição volumétrica devido à completa delimitação do rebordo alveolar (Figura 17).

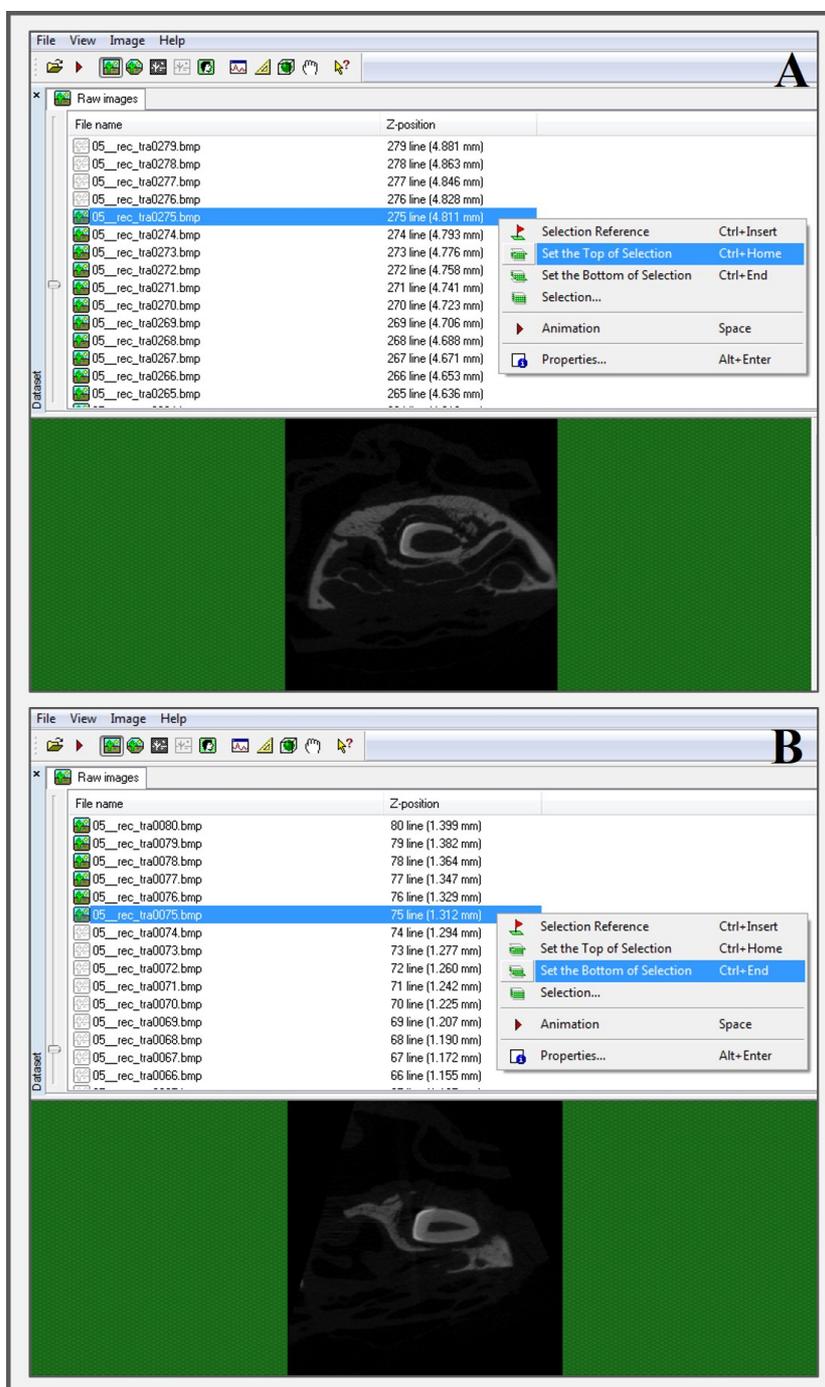
Figura 17 – Ajuste das imagens e escolha do plano transaxial



Legenda: A) imagens da peça nos planos sagital, transaxial e coronal, com eixos desalinhados; B) eixos alinhados de acordo com a região de interesse. A seta amarela indica a imagem correspondente ao plano transaxial escolhido.  
 Fonte: Elaborada pelo autor.

- d) Análise bidimensional (2D) e tridimensional (3D) das imagens utilizando o software CTAn. Inicialmente, a faixa de interesse correspondente ao terço médio da raiz e osso alveolar adjacente foi definida determinando-se a secção transaxial representativa do início do terço cervical da raiz (primeira secção onde é possível visualizar osso alveolar palatino) e do final do terço apical da raiz (última secção onde é possível visualizar a face palatina da raiz). Obtidos os valores da posição dessas duas secções (por exemplo, posição 0 e 350), calculou-se a média dos valores, obtendo-se a posição da secção representativa do terço médio (175). A partir dessa secção (175), foram selecionadas 100 secções para cima (“top selection” até a secção 275) e 100 secções para baixo (“bottom selection” até a secção 75) para compor a faixa de interesse (Figura 18).

Figura 18 – Seleção da faixa de interesse correspondente ao terço médio da raiz e osso alveolar adjacente

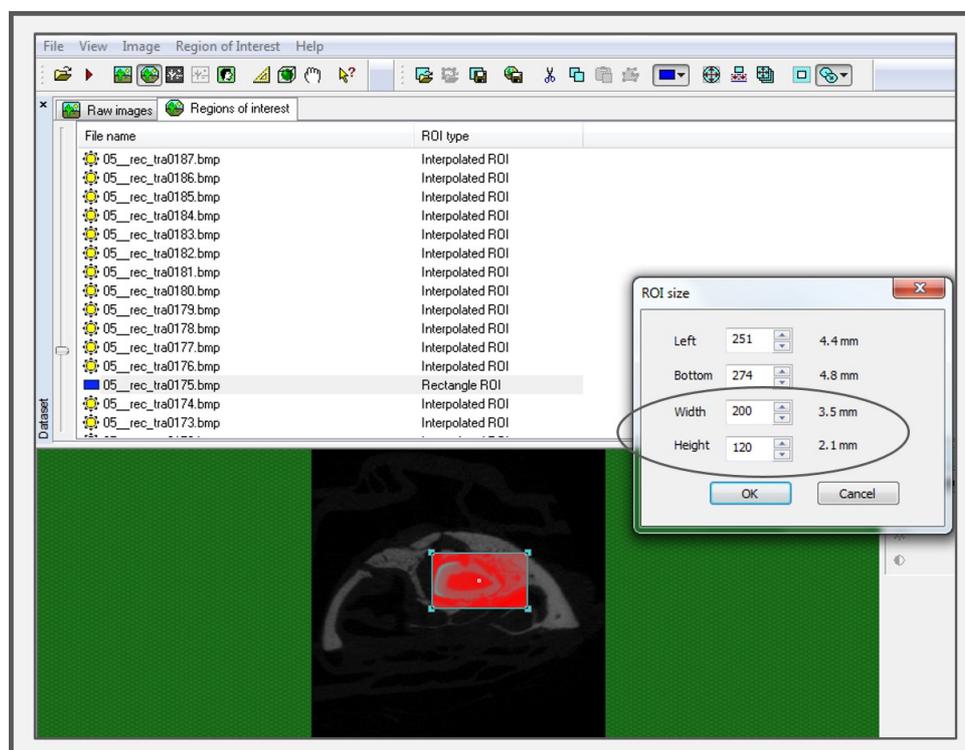


Legenda: A) seleção da faixa superior (“top selection”) e B) da faixa inferior (“bottom selection”) de interesse.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma vez definida a faixa de interesse, procedeu-se à escolha da figura geométrica mais adequada para análise do ROI, o retângulo. Essa forma geométrica foi padronizada com 3,5 mm de largura e 2,1 mm de altura em todas as peças a fim de se obter uma análise comparativa do volume de tecido mineralizado dentro do mesmo volume tecidual total correspondente ao ROI. As dimensões e posição do retângulo sobre o ROI foram estabelecidas de forma a abranger todo o contorno das paredes radiculares, com a orientação do seu maior eixo no sentido vestibulo-palatino, a partir do limite mais externo da parede vestibular até o osso alveolar palatino adjacente (Figura 19). O volume de interesse (VOI) foi então determinado pela área do retângulo sobre o ROI em toda a faixa de interesse que abrangeu 201 secções transaxiais.

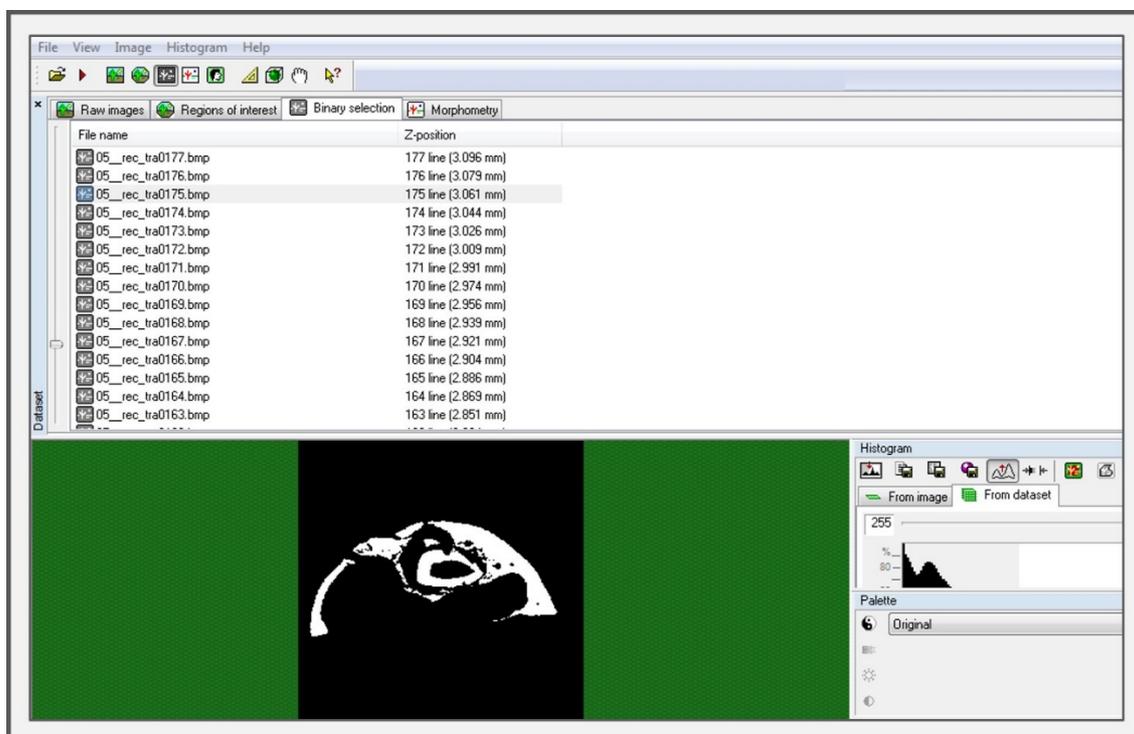
Figura 19 – Padronização da figura geométrica sobre a região de interesse (ROI)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Em seguida, foi realizada a binarização das imagens do VOI para diferenciar o tecido mineralizado (dentário ou ósseo) do restante do tecido (tecido mole, áreas de reabsorção inflamatória, trabéculas ou espaços), utilizando-se um *threshold* (valor limiar) dos tons de cinza que será aplicado aos pixels de cada ROI. Esse valor limiar foi estabelecido em 255 (*threshold* máximo da escala de cinzas), ou seja, todos os pixels com tons de cinza igual ou superior ao do limiar é convertido em um valor denominado saturado (1 = região da secção transaxial que contém tecido mineralizado) e os pixels com tons de cinza inferiores aos do limiar são convertidos em um valor não saturado (0 = região da secção transaxial que não contém tecido mineralizado), representados pelas cores branco e preto, respectivamente, cuja cor branca corresponde ao tecido mineralizado e a cor preta ao restante do tecido (não mineralizado) (Figura 20).

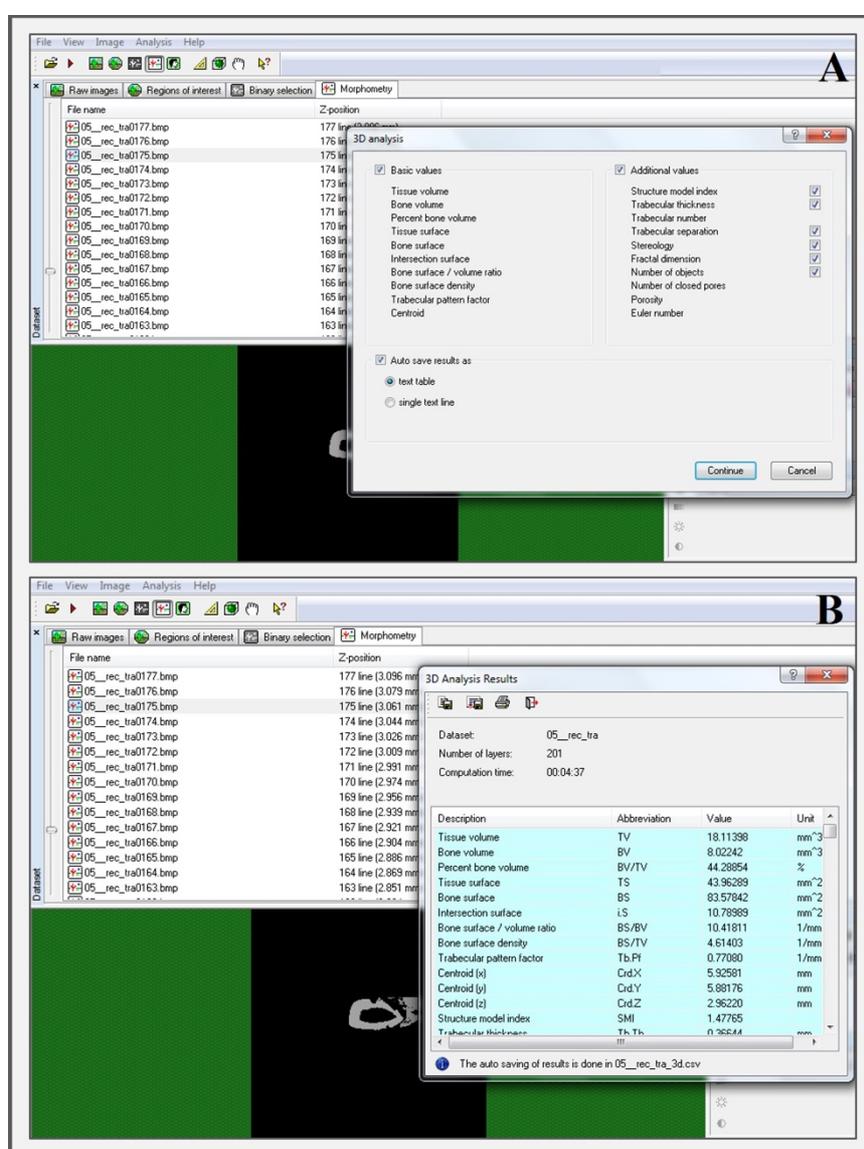
Figura 20 – Binarização de uma das secções transaxiais da peça



Fonte: Elaborada pelo autor.

Com o *threshold* estabelecido, o software CTAn analisou os dados morfométricos bidimensionais e tridimensionais de interesse, a saber: volume – VT ( $\text{mm}^3$ ), superfície – ST ( $\text{mm}^2$ ), proporção – VT/VI (%) e densidade – ST/VI ( $\text{mm}^{-1}$ ) de tecido mineralizado dentro do VOI, sendo VT volume de tecido mineralizado, ST superfície de tecido mineralizado e VI volume de interesse (VOI) (Figura 21).

Figura 21 – Análise dos parâmetros de interesse através do software CTAn

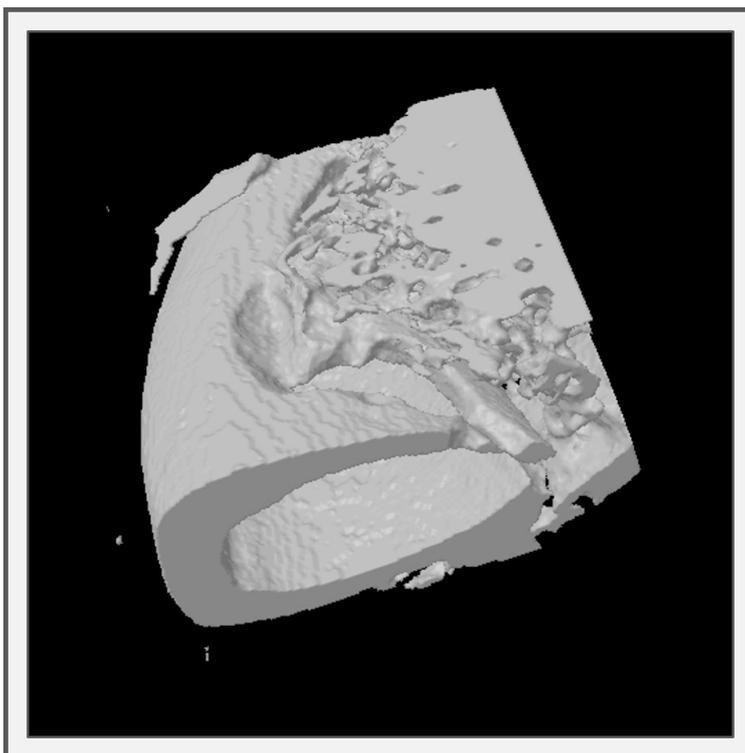


Legenda: A) seleção dos parâmetros de interesse a serem analisados pelo software CTAn; B) dados morfométricos calculados pelo CTAn e suas respectivas unidades de medida.

Fonte: Elaborada pelo autor.

- e) Reconstrução e visualização tridimensional do VOI com base nos dados dos parâmetros analisados, utilizando os softwares CTAn e CTVol (versão 2.2.3.0, SkyScan, Bruker microCT), respectivamente (Figura 22).

Figura 22 – Imagem 3D do volume de interesse (VOI)



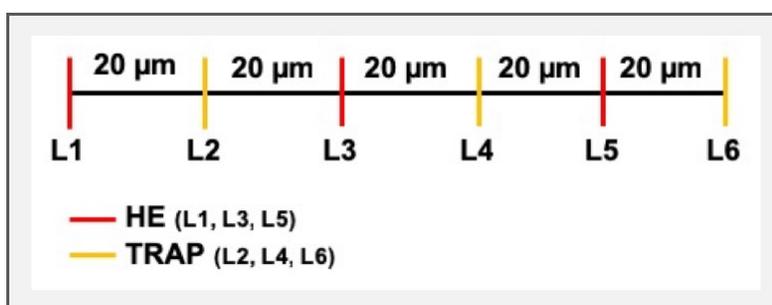
Fonte: Elaborada pelo autor.

### **Processamento histológico**

Após análise por  $\mu$ CT, as peças foram descalcificadas em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10% por 3 meses, com trocas da solução a cada 48 horas, e processadas histologicamente para inclusão em parafina. Em seguida, as peças foram cortadas em secções histológicas longitudinais com uso de micrótomo automatizado (Leica RM2255, Leica Microsystems, Nussloch, Germany). O corte foi iniciado a partir do nível em que o espaço do canal radicular era

observado, ou seja, no centro da raiz. Foram realizados 6 cortes semisseriados com espessura das secções histológicas de 5  $\mu\text{m}$  e intervalos de 20  $\mu\text{m}$  entre elas, as quais foram montadas em lâminas convencionais e submetidas à coloração por hematoxilina-eosina (HE) e pela fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), respectivamente, sendo 3 lâminas com uma secção histológica para cada técnica, seguindo o fluxograma da figura 23.

Figura 23 – Fluxograma dos cortes histológicos por peça e distribuição sequencial das lâminas para cada análise histológica



Fonte: Elaborada pelo autor.

### Coloração por hematoxilina-eosina (HE)

As secções histológicas preparadas para a coloração por HE foram desparafinizadas em xilol, reidratadas em série decrescente de etanol e processadas como segue:

- a) Imersão das lâminas em solução de hematoxilina por 5 minutos e posterior lavagem em água corrente por 3 minutos;
- b) Passagem em solução diferenciadora contendo 100 mL de água destilada e 1 gota de hidróxido de amônio, e posterior lavagem em água de torneira (3 passadas);
- c) Passagem em álcool absoluto;
- d) Imersão das lâminas em solução de eosina por 2 minutos;

- e) Desidratação em série crescente de etanol e imersão em xilol por 2 minutos;
- f) Montagem com resina sintética (Entellan®, Merck KGaA, Darmstadt, HE, Alemanha).

### **Coloração histoquímica pela fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP)**

As secções histológicas preparadas para a reação enzimo-histoquímica com a TRAP foram desparafinizadas em xilol, reidratadas em série decrescente de etanol, e processadas de acordo com as etapas descritas a seguir. O Kit TRAP 387A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizado seguindo as recomendações do fabricante para marcar osteoclastos por meio da detecção da fosfatase ácida tartarato-resistente produzida por essas células.

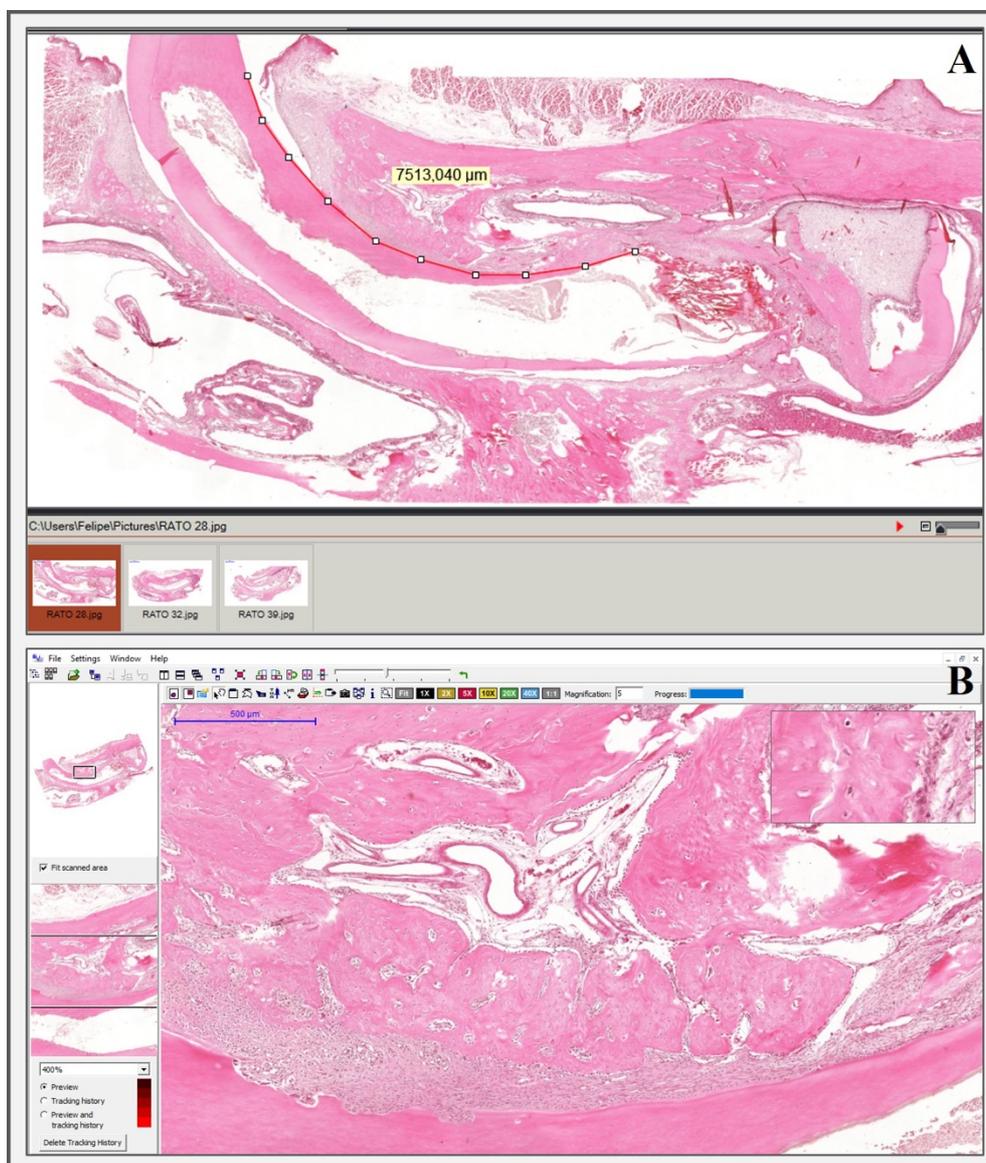
- a) Preparo da solução de fixação: 25 mL de solução de citrato, 65 mL de acetona e 8 mL de formaldeído a 37%;
- b) Imersão das lâminas na solução de fixação por 30 segundos em temperatura ambiente e posterior lavagem em água deionizada a 37,5° C (2 passadas);
- c) Preparo da solução de granada: 45 mL de água deionizada pré-aquecida a 37,5° C, 1 mL da solução de fast garnet com nitrito de sódio na proporção de 1:1, 0,5 mL de naftol, 2 mL de acetato, 1 mL de tartarato;
- d) Imersão das lâminas na solução de granada a 37,5° C, mantendo em banho-maria por 1 hora, e posterior lavagem em água deionizada a 37,5° C (2 passadas);
- e) Contra-coloração com hematoxilina de Gill n° 3 por 2 minutos e posterior lavagem em água de torneira (5 passadas);
- f) Secagem em temperatura ambiente e montagem com resina sintética (Entellan®).

## Escaneamento das lâminas e padronização da área de análise

Uma vez submetidas às respectivas técnicas histológicas, todas as lâminas foram escaneadas utilizando o aparelho Panoramic Desk (3DHISTECH Ltd., Budapeste, Hungria) e o software Panoramic Scanner (3DHISTECH Ltd., Budapeste, Hungria). Apenas o terço médio da face palatina da raiz e osso alveolar adjacente foi considerado para as análises porque o dente do rato apresenta cemento e ligamento periodontal nessa face e em partes da mesial e distal da raiz (Eccles et al., 1964), e porque o terço médio não é danificado pelos procedimentos cirúrgicos. Por outro lado, os terços cervical e apical podem ser danificados, respectivamente, pela ação dos instrumentos durante a extração e pela ação de corte da lâmina de bisturi durante a remoção da papila dental ou regularização do ápice radicular (Santos et al., 2009).

A área representativa do terço médio da face palatina da raiz e osso alveolar adjacente foi padronizada em todas as imagens por meio do software Panoramic Viewer<sup>®</sup> versão 1.15.4 (3DHISTECH Ltd., Budapeste, Hungria). Inicialmente, o comprimento total médio da raiz foi medido a partir de 3 secções histológicas de animais diferentes, utilizando o software Leica Application Suite versão 4.10 (Leica Microsystems Ltd., Heerbrugg, Suíça) e uma ferramenta de medição calibrada em micrometros ( $\mu\text{m}$ ) (Figura 24 A). O valor obtido foi dividido por 3 para se obter o comprimento de cada terço radicular estabelecido em 2548  $\mu\text{m}$ . Com base nessa medida, uma nova imagem abrangendo apenas o terço médio da raiz e osso alveolar adjacente foi extraída de cada imagem inicial obtida do escaneamento, utilizando o software Panoramic Viewer<sup>®</sup>, com aumento estabelecido em 5x (Figura 24 B). Essas imagens foram armazenadas em um microcomputador no formato JPEG para posterior análise.

Figura 24 – Padronização da área de análise



Legenda: A) medição do comprimento total médio da raiz com base na parede palatina; B) imagem do terço médio da face palatina da raiz e osso alveolar adjacente correspondente à área de análise padronizada.

Fonte: Elaborada pelo autor.

## Análise histomorfométrica

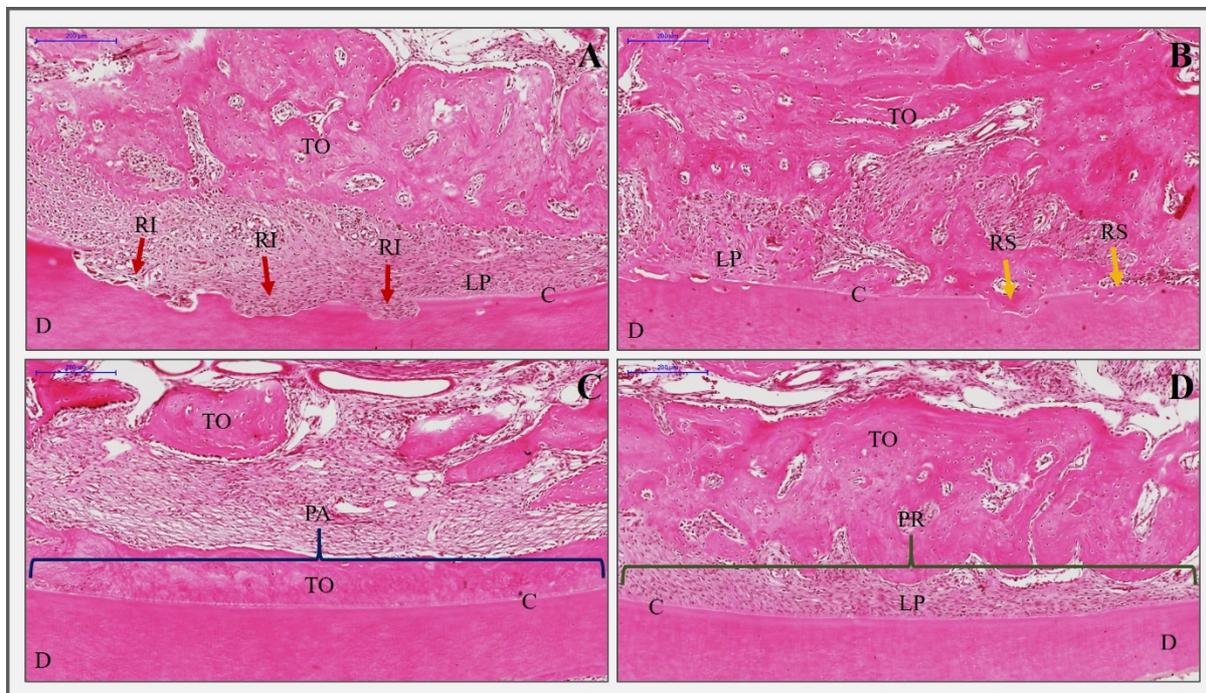
As imagens das secções histológicas coradas por hematoxilina-eosina (HE) foram avaliadas quanto à presença e extensão de áreas de reabsorção radicular

inflamatória (RI) e por substituição (RS), perímetro com anquilose (PA) e perímetro de reparo periodontal (PR), utilizando escores semiquantitativos adaptados de Carvalho et al. (2016). A intensidade de RI, RS, PA e PR foi classificada como ausente (escore 1: ausência de RI, RS, PA ou PR), discreto (escore 2: presença de RI, RS, PA ou PR em <25% do perímetro observado), moderado (escore 3: presença de RI, RS, PA ou PR em 25-50% do perímetro observado) e intenso (escore 4: presença de RI, RS, PA ou PR em >50% do perímetro observado).

Áreas de reabsorção envolvendo dentina e preenchidas por tecido conjuntivo exibindo infiltrado celular inflamatório foram definidas como reabsorção radicular inflamatória (RI). Aquelas em que o tecido ósseo obliterou a área foram definidas como reabsorção por substituição (RS) (Santos et al., 2009; Saito et al., 2011). Anquilose (PA) foi definida como união direta de tecido ósseo com cimento intacto (Saito et al., 2011) e reparo periodontal (PR) foi considerado quando observado cimento intacto recoberto por tecido conjuntivo rico em fibras colágenas e fibroblastos (Santos et al., 2009) (Figura 25).

Os parâmetros histométricos foram calculados utilizando o software Leica Application Suite®. Todas as análises foram feitas de forma cega por um examinador previamente treinado. O cegamento foi realizado através de codificação numérica das lâminas de acordo com o número do animal, impossibilitando a identificação das mesmas em relação ao grupo experimental pelo examinador. O total de 144 imagens de todos os grupos foram analisadas.

Figura 25 – Fotomicrografias de secções histológicas longitudinais coradas com hematoxilina-eosina (HE). Coloração HE, 10x no software Pannoramic Viewer®



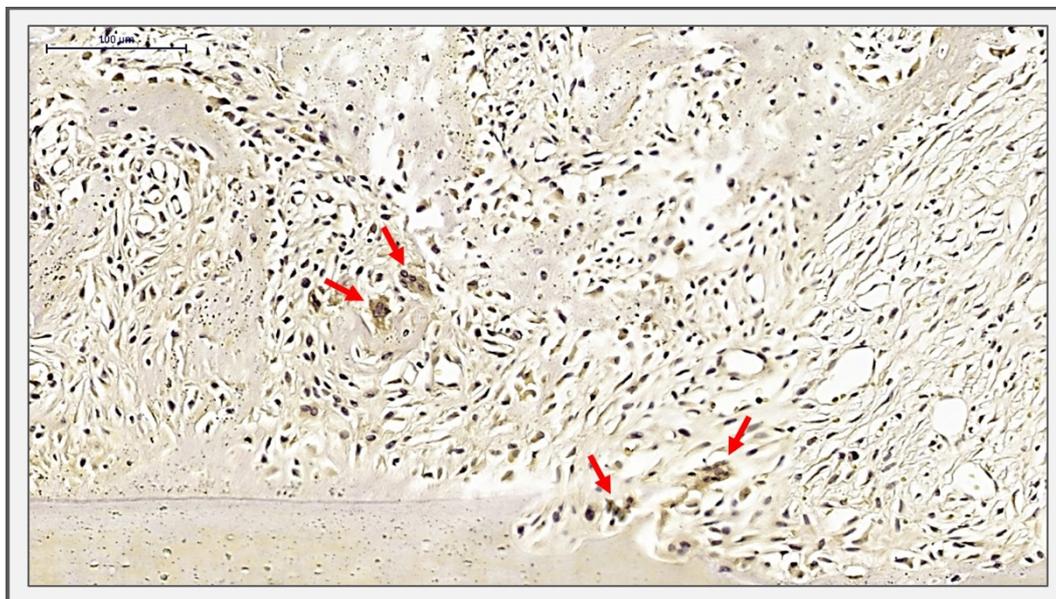
Legenda: A) áreas de reabsorção radicular inflamatória (RI = setas vermelhas), B) áreas de reabsorção por substituição (RS = setas amarelas), C) perímetro com anquilose (PA = setas azuis) e D) perímetro de reparo periodontal (PR = setas verdes). Dentina (D), cimento (C), ligamento periodontal (LP), tecido ósseo (TO).

Fonte: Elaborada pelo autor.

### Análise histoquímica

As imagens das secções histológicas coradas pela fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) foram avaliadas quanto à atividade osteoclástica por meio da contagem de osteoclastos no osso alveolar adjacente à parede palatina do terço médio da raiz. Células multinucleadas positivas para TRAP contendo dois ou mais núcleos e citoplasma corado em marrom foram consideradas osteoclastos (Figura 26). A contagem foi feita de forma cega por um examinador previamente treinado, utilizando o software Pannoramic Viewer® nas três secções histológicas para cada amostra. O total de 144 imagens de todos os grupos foram analisadas.

Figura 26 – Fotomicrografia de uma secção histológica corada pela TRAP mostrando osteoclastos multinucleados (setas vermelhas). Coloração TRAP, 40x no software Pannoramic Viewer®



Fonte: Elaborada pelo autor.

### **Análise estatística**

Todos os dados foram submetidos à análise de distribuição gaussiana (normalidade) por meio do teste de Shapiro-Wilk. A análise de variância (ANOVA) foi aplicada aos dados normais para detectar diferenças significativas entre as médias dos diferentes grupos seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas quando a variância foi significativa. Dados não normais foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. O nível de significância adotado nesses testes foi de 5%. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

**ANEXO A – Comprovante de artigo submetido****Dental Traumatology - Manuscript ID DT-02-19-OA-4082**

Erica Alexis Bacay <onbehalf@manuscriptcentral.com>

Seg, 25/02/2019 21:31

Para: felipe\_smatos@hotmail.com <felipe\_smatos@hotmail.com>

25-Feb-2019

Dear Dr Matos:

Your manuscript entitled "Topical application of adrenergic blockers on late replanted rat incisors: cytotoxic, microtomographic and histomorphometric evaluation" has been successfully submitted online. Within the next few days your manuscript will be checked for its compliance with the journal's requirements. If anything does not comply with the Journal's requirements, you will be notified by email that your manuscript has been unsubmitted and returned to your author centre. The email will include detailed explanation of the changes to be made before your manuscript can be resubmitted and considered for publication in the Dental Traumatology.

Your manuscript ID is DT-02-19-OA-4082.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <https://mc.manuscriptcentral.com/dt> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/dt>.

Thank you for submitting your manuscript to the Dental Traumatology.

Sincerely,  
Erica Bacay  
Dental Traumatology Editorial Office

---

## ANEXO B – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

INSTITUTO DE CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO  
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** O ESTRESSE CRÔNICO E A VIA DE SINALIZAÇÃO ADRENÉRGICA NA PROGRESSÃO DA PERIAPICOPATIA E NA REINTEGRAÇÃO PÓS-REIMPLANTE DENTÁRIO: UM ALVO TERAPÊUTICO POTENCIAL

**Pesquisador:** Renata Falchete do Prado

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 51548015.4.0000.0077

**Instituição Proponente:** Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.450.087

#### Apresentação do Projeto:

Este estudo avaliará a importância do estresse crônico (EC) na estimulação do sistema nervoso autônomo simpático e explorará os mecanismos de periapicopatia subjacente e inflamação pós-reimplante dentário. Utilizará modelo animal de periapicopatia, reimplante e estresse crônico, bem como cultura de fibroblastos humanos. A expressão da tirosina-hidroxilase, os níveis de proteína do receptor 1-adrenérgico (1-AR) e do receptor 2-adrenérgico (2-AR) serão avaliados. Além disso, os fibroblastos do ligamento periodontal humano serão estimulados com lipopolissacarídeos (LPS) para imitar o processo de inflamação. A proliferação dos fibroblastos e a expressão de 1-AR e 2-AR serão avaliados. As citocinas inflamatórias Interleucina (IL) -1, IL-6 e IL-8 serão detectados após pré-tratamento com os bloqueadores dos receptores adrenérgico fentolamina / propranolol, tanto in vitro como in vivo. Os dados serão avaliados por testes estatísticos descritivos e inferenciais, conforme dados obtidos, segundo sua normalidade, com testes paramétricos ou não paramétricos.

**Endereço:** Av. Engº Francisco José Longo 777

**Bairro:** Jardim São Dimas **CEP:** 12.245-000

**UF:** SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS

**Telefone:** (12)3947-9078 **Fax:** (12)3947-9010 **E-mail:** cep@focjc.unesp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO  
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



Continuação do Parecer: 1.450.087

**Objetivo da Pesquisa:**

Este presente estudo foi delineado com objetivo de esclarecer os mecanismos pelos quais o Estresse Crônico acarreta em estimulação do sistema nervoso autônomo simpático no periodonto e sua possível interferência na periapicopatia e resposta ao reimplante dentário. Em se encontrando influência do estresse crônico sobre tais eventos inflamatórios, será objetivo elucidar uma via farmacológica de modulação inflamatória.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Ok, foi reformulado.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Ok

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

ok, foi reformulado segundo a orientação colocada na pendência.

**Recomendações:**

A pesquisadora deverá se ater ao envio dos relatórios parciais e finais, via Plataforma Brasil (Notificações). Não ocorrendo o envio de relatórios, o CEP deixará de analisar futuras submissões, até que a pendência seja resolvida.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

todas as pendências foram resolvida, sou de parecer favorável a execução.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Colegiado acata o parecer da relatora.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_632024.pdf	03/03/2016 10:56:05		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	novo_TCLE.docx	03/03/2016 10:55:29	Renata Falchete do Prado	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_corrigido.docx	18/01/2016 10:54:39	Renata Falchete do Prado	Aceito

**Endereço:** Av.Engº Francisco José Longo 777

**Bairro:** Jardim São Dimas

**CEP:** 12.245-000

**UF:** SP

**Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS

**Telefone:** (12)3947-9078

**Fax:** (12)3947-9010

**E-mail:** cep@fosjc.unesp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO  
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



Continuação do Parecer: 1.450.087

Folha de Rosto	folhaderostoassinada.pdf	01/12/2015 10:55:32	Renata Faichete do Prado	Aceito
Orçamento	proforma2.xls	24/11/2015 13:58:13	Renata Faichete do Prado	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	24/11/2015 13:54:29	Renata Faichete do Prado	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO JOSE DOS CAMPOS, 14 de Março de 2016

---

**Assinado por:**  
**Denise Nicodemo**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av.Engº Francisco José Longo 777  
**Bairro:** Jardim São Dimas **CEP:** 12.245-000  
**UF:** SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS  
**Telefone:** (12)3947-9078 **Fax:** (12)3947-9010 **E-mail:** cepf@fosjc.unesp.br

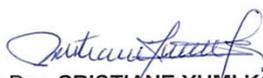
## ANEXO C – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



**CERTIFICAMOS**, que a proposta intitulada **“O Estresse crônico e a via de sinalização adrenérgica na progressão da periapicopatia e na reintegração pós-reimplante dentário: Um alvo terapêutico potencial?”** registrada com o nº 001 /2016 , sob a responsabilidade de **RENATA FALCHETE DO PRADO** e que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA – ICT – CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS-UNESP), em reunião de 11/03/2016.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/04/2016 a 30/11/2017
Espécie/linhagem/raça	Rato/heterogênico Wistar
Nº de Animais	112
Peso/Idade	400 grs / 90 dias
Sexo	MACHO
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP

São José dos Campos, 11 de março de 2016

  
 Profa. Dra. **CRISTIANE YUMI KOGA ITO**  
 Vice- Coordenadora