

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Erica dos Santos Carvalho

**EFEITOS DO LASER DE DIODO E DO FATOR DE
CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS NO PROCESSO DE
REPARO APÓS REIMPLANTE TARDIO**

Taubaté - SP
2013

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Erica dos Santos Carvalho

**EFEITOS DO LASER DE DIODO E DO FATOR DE
CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS NO PROCESSO DE
REPARO APÓS REIMPLANTE TARDIO**

Tese apresentada para a obtenção do Título de Doutor pelo Programa de Pós-graduação em Odontologia do Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté.
Área de concentração: Endodontia
Orientador: Prof^a. Dr^a. Denise Pontes Raldi

Taubaté - SP
2013

**Ficha catalográfica elaborada por
Liliane Castro – Bibliotecária CRB-8/6748**

C331e Carvalho, Erica dos Santos
Efeitos do laser de diodo e do fator de crescimento de fibroblastos no processo de reparo após reimplante tardio / Erica dos Santos Carvalho. - 2013.
99f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade de Taubaté, Departamento de Pós-graduação em Odontologia, 2013.
Orientação: Profa. Dra. Denise Pontes Raldi, Departamento de Odontologia.

1. Fatores de crescimento de fibroblastos. 2. Laser. 3. Reimplante dentário. 4. Reabsorção da raiz. 5. Reparo periodontal. I. Título.

ERICA DOS SANTOS CARVALHO

Data: _____

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Denise Pontes Raldi – Universidade de Taubaté

Assinatura _____

Profa. Dra. Ana Lia Anbinder – UNESP São José dos Campos

Assinatura _____

Profa. Dra. Ana Paula Martins Gomes – UNESP São José dos Campos

Assinatura _____

Profa. Dra. Sandra Márcia Habitante – Universidade de Taubaté

Assinatura _____

Prof. Dr. José Roberto Cortelli – Universidade de Taubaté

Assinatura _____

Dedico este trabalho...

À minha família, meu grande porto seguro:

*Meus pais, Aldenildes e Antônio Sérgio, pelo amor, apoio,
torcida, exemplos de dignidade!*

*Minha irmã Emanuelle, pelo carinho, amizade e
companheirismo.*

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado vida e saúde durante todo esse período, e pela sua infinita bondade comigo em todos os momentos. Obrigada, Senhor!

À minha orientadora, Profa. Dra. Denise Pontes Raldi, pelo apoio, dedicação e empenho pela pesquisa e estudos. Espero continuar com essa grande parceria que desenvolvemos durante esses cinco anos não só na minha vida profissional, como também na minha vida pessoal. Obrigada pela tolerância nos momentos difíceis, e por ter me ensinado muitas coisas além da ciência, como aprender a lidar com as diferenças e descobrir que para se viver bem, devemos compreender e aceitar o próximo.

Ao Prof. Dr. João Marcelo Ferreira de Medeiros, pelo apoio, amizade e longas conversas. Levarei para sempre as boas lembranças da sua alegria comigo. Continue sendo este excelente professor e ser humano bondoso.

À Profa. Dra Sandra Márcia Habitante, por todo carinho e atenção. Contigo aprendi realmente o significado da palavra mestre.

Ao Prof. Dr. José Luiz Lage-Marques, um exemplo de professor, pesquisador e profissional. Obrigada pela atenção e sugestões sempre atuais e inovadoras.

À Profa. Dra Ana Christina Claro Neves, pela disponibilidade e acessibilidade. Agradeço pela sua sensatez e palavras amigas sempre que precisei durante toda a minha pós-graduação.

A todos os Professores da UNITAU que contribuíram grandemente para esta minha formação, José Roberto Cortelli, Laís Concílio, Sheila Cortelli, Gilson Franco, Karina Cogo, Davi Aquino, Débora Pallos, Marcos Augusto do Rego, Mariella Leão, Priscila Liporoni, Silvana Soléo, Maximiliano Neisser e Edna Chamon.

À Profa Dra Ana Lia Anbinder, um exemplo de pesquisadora séria, dedicada e competente. Agradeço pela atenção e cordialidade em todas as etapas da pesquisa, além de ter nos cedido o laboratório de Patologia da UNESP.

À técnica de Histologia Maria de Fátima Pacheco, pelo valioso auxílio e prestatividade durante a confecção das lâminas, e à Profa Dra Milene Galhardo, pela receptividade durante todo o período que trabalhei no Laboratório de Histologia.

Aos funcionários do Laboratório de Fisiologia, pela colaboração na experimentação animal.

Aos animais que sublimaram a própria vida para o desenvolvimento da ciência.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação em Odontologia, em especial, à Adriana Peloggia, pela atenção e eficiência nas orientações que precisei.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste experimento.

A todos os meus queridos colegas e amigos do doutorado, que dividiram comigo os momentos alegres e de dificuldades. Em especial, a Graziela Salum, uma irmã que eu ganhei e que pude contar sempre com sua alegria e amizade, e a Suzane Raslan, pelo carinho, cumplicidade e conselhos.

Aos meus colegas e amigos da disciplina de Endodontia da Universidade Federal da Bahia, Sílvio Albergaria, Maria de Fátima Malvar, Fabíola , Mara, Lívia, Rosângela e Luciana, pela torcida e apoio nos momentos que precisei me ausentar para cumprir com os meus deveres do doutorado.

À minha irmã e jurista Emanuelle, pela revisão ortográfica desta tese.

À minha mãe e sócia Aldenildes, pela competência em administrar a nossa clínica enquanto eu me ausentava, me dando todo o suporte estrutural e emocional.

A todos os meus tios, primos e amigos que fazem parte da minha história e neste momento estão vibrando com essa minha conquista!

Sonhe com aquilo que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que quer.

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades
que aparecem em seus caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem
a importância das pessoas que passaram por suas vidas.

Clarice Lispector

Carvalho ES. Efeitos do laser de diodo e do fator de crescimento de fibroblastos no processo de reparo após reimplante tardio [Tese de doutorado]. Taubaté: Universidade de Taubaté, Departamento de Odontologia, 2013. 99f.

RESUMO

Objetivo: Avaliar por meio de análises radiográfica e histológica os efeitos da associação do laser de diodo e do fator de crescimento de fibroblastos no tratamento de dentes de ratos reimplantados tardiamente. **Método:** Cinquenta ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) tiveram seus incisivos superiores direitos extraídos, a papila dental removida, e por via retrógrada, o preparo e preenchimento dos canais radiculares com pasta de hidróxido de cálcio. Em seguida, os espécimes foram aleatoriamente divididos em cinco grupos: C+ (controle positivo)- reimplante imediato; C- (controle negativo)- reimplante tardio, mantidos em meio ambiente seco por sessenta minutos, sem tratamento adicional; LA (laser de alta potência)- reimplante tardio associado ao tratamento prévio da superfície radicular com irradiação por varredura com laser diodo de alta potência (810nm, modo contínuo, fibra óptica de 600µm, 1,5W input, 30s); FGF (Fator de crescimento de fibroblastos)- reimplante tardio associado à aplicação do fator de crescimento de fibroblastos 50 µg na concentração de 0,2% FGF-2 em gel de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) a 3% sobre a superfície radicular lingual e no interior do alvéolo dental de cada espécime; LA+FGF (Laser de alta potência e FGF)- reimplante tardio, com tratamento prévio da superfície radicular com laser diodo nos mesmos parâmetros do grupo LA, associado à aplicação do FGF-2 da mesma forma que no grupo FGF. A eutanásia dos animais ocorreu após sessenta dias. Os espécimes foram radiografados digitalmente e processados para análise descritiva dos eventos histológicos e análise da porcentagem de fibras colágenas do tipo I por meio do método Picrosirius Red. **Resultados:** Na análise radiográfica, o grupo LA+FGF apresentou o menor número e porcentagem de áreas reabsorvidas ($p < 0,05$). Com a análise dos eventos histológicos por meio de escores, o grupo LA apresentou as menores médias de reabsorção substitutiva e inflamatória e anquilose, seguido pelo grupo LA+FGF e não diferindo estatisticamente do grupo controle positivo. O grupo LA+FGF apresentou o melhor reparo periodontal entre os grupos experimentais, com a maior quantidade de fibras colágenas espessas, ($p < 0,05$). **Conclusões:** A irradiação da superfície radicular com laser de diodo de alta potência associada ou não ao FGF-2 reduziu a incidência de reabsorções radiculares externas e anquilose. A aplicação do FGF-2 favoreceu o reparo do ligamento periodontal, embora a reinserção das fibras não tenha ocorrido em todos os espécimes.

Palavras-chave: Fatores de crescimento de fibroblastos; Laser; Reimplante dental; Reabsorção da raiz; Reparo periodontal.

Carvalho ES. Effects of diode laser and fibroblasts growth factor on the healing process after delayed replantation [Tese de doutorado]. Taubaté: Universidade de Taubaté, Departamento de Odontologia, 2013. 99f.

ABSTRACT

Aim: The aim of this study was to evaluate, by radiographic and histological analyses, the effects of high-power diode laser irradiation and fibroblast growth factor (FGF) in the treatment of delayed replanted rat teeth. **Methods:** Fifty rats (*Rattus norvegicus albinus*, *Wistar*) had their maxillary right incisors extracted, the dental papilla removed, and by a retrograde way, the root canals were prepared and filled with calcium hydroxide paste. Subsequently, the specimens were randomly assigned to five groups: C+ (positive control)- immediate replantation; C- (negative control)- delayed replantation, left on the bench for sixty minutes, without additional treatment; LA (Diode laser high potency)- delayed replantation and root surface treatment scanning irradiation with a high-power diode laser (810nm, continuous mode, optic fiber 600µm, 1.5W input, 30s); FGF (Fibroblast Growth Factor) - delayed replantation and topical application of 50µg 0,2% FGF-2 gel in 3% hydroxypropyl methylcellulose matrix (HPMC) over the lingual root surface and into dental alveolus of each specimen; LA+FGF (Diode laser high potency + Fibroblast Growth Factor)- delayed replantation and root surface treatment irradiation with a diode laser using the same parameters as those used for LA group, associated to topical application of FGF-2 in the same way as FGF group. The rats were euthanized after sixty days of replantation. The specimens were digitally radiographed and processed for descriptive histological events analysis and percentage analysis of type I collagen fibers by the Picrosírius red method. **Results:** By radiographic analysis, the minor number and percentage of resorpted areas were seen in LA+FGF group ($p < 0.05$). In the histological analysis through scores, the LA group showed lower means of replacement and inflammatory resorption and ankylosis and followed by LA+FGF group and they were not statistically different of positive control group. The LA+FGF group showed the best periodontal healing of all experimental groups, with the greater number of thick collagen fibers stained ($p < 0,05$). **Conclusions:** The irradiation of root surface treatment with high-power diode laser associated or not to FGF-2 reduced the occurrence of external root resorption and ankylosis. The FGF-2 application favored the periodontal ligament healing, but the fibers reinsertion not occurred in all the specimens.

Keywords: Fibroblasts growth factors; Laser; Tooth replantation; Root resorption; Periodontal healing.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Porcentagens e número das áreas de reabsorção radicular e desvio padrão nos diferentes grupos	53
Tabela 2 – Frequência dos escores atribuídos aos eventos histológicos de acordo com cada grupo	64
Tabela 3 – Frequência dos escores atribuídos às características do tecido conjuntivo de acordo com cada grupo	65
Tabela 4 – Frequência dos escores atribuídos à presença de fibras do ligamento periodontal e sua reinserção ao cimento	66
Tabela 5 – Médias e desvio padrão da quantificação das fibras colágenas nos diferentes grupos	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Procedimento de exodontia	39
Figura 2 – Preparo do dente e reimplante	42
Figura 3 – Equipamento Laser de Diodo de alta potência	42
Figura 4 – Tratamento para indução da regeneração periodontal	43
Figura 5 – Padronização das tomadas radiográficas	45
Figura 6 – Cálculo das áreas de reabsorção externa com o programa Image-Pro Plus 7.0	46
Figura 7– Foto representativa do sistema de análise de imagens, demons- trando um campo microscópico contendo fibras colágenas polarizadas (Aumento 400X)	50
Figura 8 – Foto representativa do sistema de análise de imagens, demons- trando a seleção das fibras colágenas do tipo I	50
Figura 9 – Foto representativa do sistema de análise de imagens processando a mensuração da área ocupada por fibras colágenas do tipo I	51

Figura 10 – Comparação das médias (%) das áreas de reabsorção entre os grupos	54
Figura 11 – Comparação das médias dos números das áreas de reabsorção	54
Figura 12 – Imagem radiográfica representativa das áreas de reabsorção do elemento dental do grupo controle positivo (C+) e seu homólogo	55
Figura 13 – Imagem radiográfica representativa das áreas de reabsorção do elemento dental do grupo controle negativo (C-) e seu homólogo	56
Figura 14 – Imagem radiográfica representativa das áreas de reabsorção do elemento dental do grupo irradiado com laser de alta potência (LA) e seu homólogo	56
Figura 15 – Imagem radiográfica representativa das áreas de reabsorção do elemento dental tratado apenas com fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e seu homólogo	57
Figura 16 – Imagem radiográfica representativa das áreas de reabsorção do elemento dental tratado com laser de alta potência e fator de crescimento de fibroblastos (LA + FGF) e seu homólogo	57
Figura 17 – Cortes representativos do grupo C+	59

Figura 18 – Cortes representativos do grupo C-	60
Figura 19 – Cortes representativos do grupo LA	61
Figura 20 – Cortes representativos do grupo FGF	62
Figura 21 – Cortes representativos do grupo LA/FGF	63
Figura 22 – Representação gráfica das comparações das médias dos escores	64
Figura 23 - Comparação do valor dos escores de acordo com as características do tecido periodontal	66
Figura 24 - Comparação das médias das fibras colágenas coradas pelo método de coloração Picosírius Red	68
Figura 25 – Corte representativo do grupo C+ pelo método Picosírius Red	69

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA - Análise de variância

BMP - Proteína morfogenética do osso

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

Er: YAG - érbio ítrio-alumínio em forma de granada

FGF - do inglês *Fibroblast Growth Factor* - Fator de crescimento de fibroblasto

FGF-b ou FGF-2 - Fator de crescimento de fibroblasto básico

g - grama (s)

h - hora

H.E.- hematoxilina e eosina

J/cm² - Joule por centímetro quadrado (expressa a densidade de energia)

Kg - quilograma (s)

Kvp kilovolt pico – potencial elétrico

LASER - acrônimo do inglês *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*

ou amplificação da luz por emissão estimulada de radiação

LP - Ligamento Periodontal

mA - miliampere – corrente elétrica

MEV - microscopia eletrônica de varredura

mg - miligrama (s)

mJ – milijoule - unidade de energia

mJ/pulso - milijoule por pulso - unidade de energia em cada pulso

ml - mililitro (s)

mm - milímetro (s)

mm² - milímetro (s) quadrado (s)

µg - micrograma

µL - microlitro(s)

µm - micrômetro

nº - número

Nd: YAG - neodímio ítrio-alumínio em forma de granada

Nm - nanômetro

Ns - não significante estatisticamente

p - nível de significância estatística

P - potência

PDGF - fator de crescimento derivado de plaquetas

pH - potencial hidrogeniônico

s - segundos

UI - unidades internacionais

W – watt - unidade de potência

% - por cento

°C - graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 TRATAMENTO DA SUPERFÍCIE RADICULAR	21
2.2 REGENERAÇÃO DO LIGAMENTO PERIODONTAL	28
3 PROPOSIÇÃO	36
4 METODOLOGIA	37
4.1 MODELO EXPERIMENTAL	37
4.2 INTERVENÇÃO CIRÚRGICA	37
4.3 DIVISÃO DOS GRUPOS	39
4.4 REIMPLANTE DOS DENTES	43
4.5 ANÁLISE RADIOGRÁFICA	44
4.6 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	47
4.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA	47
4.7.1 ANÁLISE DESCRITIVA DOS EVENTOS HISTOLÓGICOS	47
4.7.2 ANÁLISE DOS EVENTOS HISTOLÓGICOS POR MEIO DE ESCORES	48
4.7.3 ANÁLISE QUANTITATIVA DAS FIBRAS COLÁGENAS	49
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
5 RESULTADOS	53
5.1 ANÁLISE RADIOGRÁFICA	53
5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA	58
5.2.1 ANÁLISE DESCRITIVA DOS EVENTOS HISTOLÓGICOS	58
5.2.2 ANÁLISE DOS EVENTOS HISTOLÓGICOS POR MEIO DE ESCORES	63
5.2.3 ANÁLISE QUANTITATIVA DAS FIBRAS COLÁGENAS	67
6 DISCUSSÃO	70
6.1 DA IMPORTÂNCIA DO TEMA	70
6.2 DA METODOLOGIA	71
6.3 DOS RESULTADOS OBTIDOS	76
7 CONCLUSÃO	84
REFERÊNCIAS	85
APÊNDICES	91
ANEXO	99

1 INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos comprovam a alta prevalência dos traumatismos dentários (Andreasen & Andreasen, 2001; Andersson et al., 2006). Estes representam um sério problema de saúde pública, principalmente em crianças e adolescentes, devido ao seu alto impacto psicológico e social, além das consequências indesejáveis e funcionais promovidas por tais traumatismos.

A avulsão dentária se constitui um dos traumas dentários de maior gravidade, por causar severos danos aos tecidos periodontais e necrose pulpar. O reimplante do dente em seu alvéolo sempre deve ser realizado nos casos de dentes permanentes, pois promoverá o restabelecimento da função e da estética, importante na recuperação psicológica do paciente, e na manutenção da estrutura óssea alveolar daquela região. Esta preservação do alvéolo é de extrema importância, principalmente no que tange às crianças e adolescentes, ainda em fase de crescimento ósseo, que não podem receber implantes ou próteses definitivamente (Trope, 2011; Andersson et al., 2012).

A falta de conhecimento da população em geral sobre os procedimentos do reimplante ou fatores emocionais e físicos do paciente levam, na maioria das vezes, a um reimplante tardio. Após 15 minutos expostos ao meio externo, as células do ligamento periodontal tornam-se inviáveis e necrosam, estimulando o início de um processo inflamatório que pode resultar na reabsorção radicular (Andersson & Bodin, 1990).

Nesses casos de reimplante tardio, faz-se necessário um tratamento da superfície radicular antes do reimplante tardio com o objetivo de remover o ligamento

periodontal necrosado, de forma a preservar a estrutura radicular e promover uma superfície que possibilite o reparo periodontal, além do tratamento endodôntico para eliminar a contaminação microbiana (Andreasen & Andreasen, 2001)

Diversos estudos têm sido realizados com o intuito de estabelecer a melhor terapêutica para a superfície radicular nesses casos de reimplantes tardios, contudo, ainda não foram suficientes para se estabelecer um protocolo ideal para prevenir ou estabilizar as reabsorções radiculares.

Os lasers de alta potência têm apresentado atividade antimicrobiana no sistema de canais radiculares. Além disto, quando utilizados na superfície radicular, promovem fusão e derretimento homogêneo da estrutura cementária, tornando-a mais regular, favorecendo a adesão de fibras e células do tecido conjuntivo e a neoformação de cimento. Desta forma, a superfície radicular externa torna-se biocompatível e mais resistente à ação de bactérias e das células clásticas (Kreisler et al., 2001; Haypek et al., 2006; Raldi et al., 2010).

Um estudo prévio em modelo animal utilizando laser de diodo de alta potência na superfície radicular previamente ao reimplante tardio demonstrou, por meio de análise histológica e histomorfométrica, que a irradiação no modo contínuo inibiu o aparecimento de reabsorção substitutiva e anquilose (Carvalho et al., 2012). Entretanto, ainda que obtida uma redução na incidência de reabsorção radicular externa, não houve uma reinserção periodontal perpendicular, considerada ideal. Quando houve a reinserção, esta se apresentou com fina espessura, desorganizada e com as fibras periodontais dispostas paralelamente à superfície radicular.

Como a taxa de sucesso do reimplante tradicional (incluindo vários períodos extra-alveolares) é muito imprevisível, com variação de 4 a 50%, torna-se necessário desenvolver uma nova estratégia para essa terapia (Krasner & Rankow, 1995). O

tratamento de um dente avulsionado deve envolver protocolos que visem tanto a redução das subseqüentes reabsorções radiculares externas, como a promoção da regeneração do ligamento periodontal.

A chave para a regeneração tecidual está em estimular uma cascata de eventos celulares em certo ponto, que pode resultar na coordenação e conclusão da formação do tecido integrado. Vários enfoques biológicos têm sido usados para a promoção da regeneração periodontal. Esses podem ser divididos em: uso de fatores de crescimento e diferenciação, aplicação de proteínas da matriz extracelular e fatores de adesão, além de mediadores do metabolismo ósseo (Cochran & Wozney, 1999).

Os fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) representam uma grande família de polipeptídeos, abrangem mais de 20 membros que compartilham características estruturais. Dentre a família dos FGF, o fator de crescimento básico (FGF-b ou FGF-2) é considerado o mitógeno mais potente para as células periodontais (Okamoto et al., 1997; Shimazu et al., 1999). O FGF-2 é um polipeptídeo de cadeia única, que estimula a migração e proliferação de fibroblastos e a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, cementoblastos e fibroblastos nos estágios iniciais da cicatrização, além de regular a produção de laminina induzindo a angiogênese, o que poderia intensificar a regeneração periodontal (Takayama et al., 1997; Sae-Lim et al., 2004; Stavropoulos & Wikesjo, 2012).

Estudos na periodontia, tanto em modelo animal quanto em humanos, sugerem fortemente que a aplicação tópica do FGF – 2 tem-se mostrado como uma modalidade terapêutica promissora para a regeneração dos tecidos periodontais

destruídos pela progressão da doença periodontal (Takayama et al., 2001; Murakami et al., 2003; Kitamura et al., 2011; Murakami, 2011).

Com o desenvolvimento da terapia de regeneração periodontal, surge uma nova perspectiva para o tratamento dos dentes avulsionados. Algumas pesquisas já foram direcionadas com o intuito de utilizar o FGF para estimular o reparo periodontal de dentes avulsionados, com resultados positivos (Sae-Lim et al., 2004; Sato et al., 2004; Seshima et al., 2010). Entretanto, nenhuma pesquisa foi direcionada no sentido de se associar um tratamento da superfície radicular e um tratamento estimulador do reparo periodontal nos dentes reimplantados tardiamente.

Pelo exposto, torna-se oportuno estudar a utilização de fatores de crescimento associados ao tratamento da superfície radicular com laser de diodo de alta potência antes do reimplante tardio, buscando alternativas para reduzir o risco de reabsorções radiculares e melhorar o reparo periodontal, com reinserção de fibras perpendiculares aos dentes avulsionados.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TRATAMENTO DA SUPERFÍCIE RADICULAR

Quando os dentes avulsionados são mantidos em meios inadequados e reimplantados tardiamente, pode-se presumir que o ligamento periodontal está necrosado. Este tecido necrótico serve de estímulo ao processo inflamatório sobre uma área difusa da superfície radicular, que culminará com a ativação das células clásticas, promotoras do processo de reabsorção inflamatória. Por outro lado, os cementoblastos não conseguem abranger toda a superfície cementária danificada pelo trauma, proporcionando que em algumas áreas o osso entre em contato direto com a superfície radicular externa. Neste caso, através do processo de remodelação fisiológica óssea, a raiz vai sendo substituída pelo osso, no processo conhecido como reabsorção substitutiva (Trope, 2011). Muitas pesquisas têm sido desenvolvidas, na tentativa de obter um protocolo ideal para o tratamento da superfície radicular, com o fito de inibir as reabsorções radiculares.

O tratamento da superfície radicular, anteriormente aos reimplantes tardios, também tem sido preconizado para hidratar o remanescente de tecido conjuntivo viável que se encontre aderido a ela, preservar a estrutura radicular, inibir as células reabsortivas, além de promover o reparo por meio da neoformação cementária (Barret & Kenny, 1997; Levin et al., 2001; Poi et al., 2007).

Alguns métodos de tratamento têm sido propostos para esta finalidade. Soluções ácidas como ácido cítrico, fluoreto de sódio e Vitamina C foram propostas com a intenção de facilitar a reinserção das fibras conectivas (Zervas et al., 1991;

Panzarini et al., 2005; Gulinelli et al., 2008). Da mesma forma, foram utilizados antibióticos, corticosteróides e substâncias antirreabsortivas como alendronato, acetazolamida e nitrato de gálio (Levin et al., 2001; Moreira Neto, 2002; Mori & Garcia, 2002; Keum et al., 2003; Lustosa-Pereira et al., 2006; Mori et al., 2007; Gulinelli et al., 2008). O Emdogain, um gel terapêutico derivado da matriz de esmalte, tem sido utilizado para regeneração biológica nos casos de reimplantes dentais tardios, entretanto os resultados mostram que esta substância não inibe o processo de reabsorção radicular externa (Lam & Sae-Lim, 2004; Schjott & Andreasen, 2005; Barrett et al., 2005; Poi et al., 2007). Os resultados destas terapêuticas, até o presente momento, são contraditórios, razão pela qual não se pode afirmar que estes são efetivos na prevenção das reabsorções radiculares externas, principalmente as substitutivas.

A utilização clínica do laser tem trazido muitas vantagens e sido coadjuvante dos tratamentos nas diversas especialidades. A endodontia tem sido beneficiada por muitas de suas propriedades: a capacidade do laser de vaporizar o tecido pulpar necrosado, favorecer maior limpeza da parede dentinária (remoção da smear layer), reduzir ou aumentar a permeabilidade dentinária, promover a ablação da dentina, redução bacteriana no canal radicular e diagnóstico de vitalidade pulpar (Gutknecht et al., 2004).

A aplicação do laser de diodo na odontologia é recente. Os equipamentos de lasers de diodo de alta potência são portáteis, de custo reduzido quando comparados aos outros lasers de alta potência. O comprimento de onda destes lasers para utilização na Odontologia varia entre 800nm a 980nm, e podem ser utilizados no modo pulsado, bem como no modo contínuo, e de acordo com a indicação clínica por contato ou não (Romanos & Nentwig, 1999).

O laser de diodo de alta potência reduz a permeabilidade dentinária, embora não provoque o *melting* da dentina como o laser Nd:YAG. O aparelho é composto por duas camadas de material semicondutor entrelaçadas por uma camada não condutora (bandgaplayer). Seu espectro permite melhor absorção pela água do que os tecidos dentais quando comparado ao Nd:YAG laser. Isto explica a melhor penetração da luz através da dentina, tornando então possível agir sobre os microrganismos presentes nos túbulos dentinários (De Souza et al., 2008).

Moritz et al. (1997) realizaram um estudo in vivo, onde quarenta pacientes com dentes que apresentavam canais radiculares infectados receberam, após o preparo químico mecânico, tratamento com laser de diodo de alta potência. A avaliação por meio de testes microbiológicos demonstrou uma maior redução bacteriana no grupo irradiado com laser de diodo do que no grupo tratado apenas com a técnica endodôntica convencional.

De Souza et al. (2008) também testaram in vitro a capacidade do laser de diodo de alta potência na desinfecção da dentina após preparo químico e mecânico dos canais radiculares infectados com *Enterococcus faecalis*. Os resultados demonstraram 100% de desinfecção no grupo 1, que, após preparo com instrumentos rotatórios e irrigação com hipoclorito de sódio a 0,5% e EDTA-T a 17%, recebeu irradiação com laser diodo de 830nm e potência de 3W.

No tratamento da superfície radicular, Friedman et al. (1998) estudaram os efeitos da irradiação com laser Nd:YAG em dentes de cães. As câmaras pulpares de seis pré-molares inferiores em cada um dos dois cães foram acessadas, inoculadas com placa bacteriana e seladas (Grupos 1 e 2). Adicionalmente, outros dois pré-molares de cada cão foram tratados endodonticamente e obturados sem inoculação de placa (Grupos 3 e 4). Após duas semanas, as raízes foram hemiseccionadas e

extraídas. Foram realizadas cavidades com broca nas superfícies vestibular e lingual destas raízes de forma que obtivessem áreas desnudas de cimento. Nos grupo 1 e 3, as áreas desnudas eram irrigadas com EDTA 15% e irradiadas com laser Nd:YAG com fibra de 300 μ m (0.75W, 15pps, 20s). Nos grupos 2 e 4, as áreas desnudas eram irrigadas com EDTA 15% e lavadas em solução salina por 20s. Em seguida, as raízes eram reimplantadas em cinco minutos. Os cães foram sacrificados dez semanas após o reimplante, e, então, as raízes foram submetidas à análise microscópica. Este estudo comprovou que apenas a modificação da superfície radicular promovida pela irradiação com laser de Nd:YAG não inibe a reabsorção inflamatória externa. Concluíram, também, que, no tratamento de dentes avulsionados, é mais importante direcionar os esforços ao tratamento endodôntico efetivo e oportuno do que somente induzir modificação da superfície radicular com laser.

Kreisler et al. (2001) analisaram in vitro o efeito do tratamento de superfície radicular com o laser de Diodo GaAlAs (810nm, tempo de 20s, 1,0W e em modo contínuo) na adesão de células do ligamento periodontal, por meio de microscopia eletrônica de varredura. Os autores concluíram que a irradiação com laser de diodo, nos parâmetros utilizados, não promoveu efeitos adversos na adesão celular, porém, sugerem que novos estudos devam ser realizados para analisar a indicação deste laser na descontaminação de bolsas periodontais, já que ainda se mantém questionável o fato deste tratamento promover benefícios na formação de um novo tecido conjuntivo.

Theodoro et al. (2006) avaliaram in vitro a adesão de elementos sanguíneos sobre superfícies radiculares irradiadas com laser de Er: YAG (7,6J/cm² e 12,9 J/cm²) e laser de diodo (90J/cm² e 108J/cm²), bem como a ação destes sobre as

superfícies radiculares em dentes humanos extraídos por doença periodontal, que foram previamente raspados e aplainados com instrumentos manuais. Pôde-se concluir que nenhum tratamento proposto aumentou a adesão de elementos sanguíneos de forma significativa quando comparado ao controle; o laser de Er:YAG ($12,9\text{J}/\text{cm}^2$) foi mais efetivo que o diodo ($90\text{J}/\text{cm}^2$) na adesão e, independentemente do parâmetro, promoveu alterações na morfologia das superfícies radiculares irradiadas, como micro rugosidades e, o laser de diodo, dependendo do parâmetro utilizado, pode inibir a adesão.

Haypek et al. (2006) verificaram *in vitro* a interação entre o laser de diodo de alta potência (modo contínuo e interrompido) e a superfície radicular, por meio da análise de variação de temperatura, morfologia superficial das raízes dentárias (microscopia eletrônica de varredura), análise de adesão e a proliferação de fibroblastos cultivados sobre estas superfícies. Os resultados comprovaram que o uso do laser de diodo nos parâmetros utilizados (1,5W; 808nm; 30s com a fibra óptica posicionada paralelamente à superfície radicular) foi seguro do ponto de vista térmico e causou alterações morfológicas superficiais similares, independentemente dos modos de irradiação. Outrossim, as superfícies radiculares irradiadas foram biocompatíveis, possibilitando a adesão e a proliferação celular.

Raldi et al. (2006) avaliaram o efeito da irradiação com laser Er:YAG e laser de diodo de alta potência, na adesão celular, quando aplicados em reabsorções radiculares externas simuladas. Foram utilizados nove dentes humanos, recém extraídos, que, após a realização de cavidades na superfície externa da dentina radicular, foram divididos em três grupos experimentais: o grupo I recebeu irradiação com laser de diodo de alta potência (potência na saída da fibra de 1W, tempo de 10s, fibra óptica de $300\mu\text{m}$ e intensidade de potência de $796\text{W}/\text{cm}^2$); o grupo II

recebeu irradiação com laser Er:YAG (energia no monitor de 60mJ e de saída de 25,2mJ, frequência de 10Hz, tempo de 10s, fibra óptica de 375µm e fluência na ponta da fibra de 228J/cm²) e o grupo III (controle) não foi irradiado. A adesão celular foi em ordem decrescente: Grupo I > Grupo II > Grupo III. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos irradiados com laser e o grupo controle. Os autores concluíram que a aplicação da irradiação com laser de diodo de alta potência e com laser Er:YAG, em superfícies dentinárias expostas, favoreceu a adesão celular.

Hamaoka et al. (2009) compararam in vivo a biocompatibilidade das superfícies radiculares submetidas a quatro tipos de tratamentos antes da implantação no tecido subcutâneo de ratos. Inicialmente, 48 molares humanos recém extraídos foram preparados endodonticamente e cortados abaixo da junção cimento esmalte. De acordo com o tratamento da superfície radicular antes do implante no tecido subcutâneo, os dentes foram divididos em quatro grupos experimentais (n=12): G1- mantidos a seco durante três horas; G2 – mantidos a seco por três horas, em seguida, imersos em solução de fluoreto de sódio acidulado 2.4% (pH 5.5) por vinte minutos e lavagem final com soro fisiológico; G3 – mantidos em soro fisiológico por 72h; G4 – mantidos a seco por três horas, em seguida, irradiados com laser Nd:YAG. Os animais foram sacrificados um, sete e 45 dias após. De acordo com a análise qualitativa histológica e avaliação com microscopia eletrônica de varredura, todas as raízes dentárias foram envolvidas por cápsulas de tecido conjuntivo de espessura variável. Em geral, o aspecto das superfícies radiculares foi similar, entretanto, nas superfícies irradiadas com laser, foram observadas fusão e resolidificação recobrando os túbulos dentinários. Assim, concluíram que a irradiação da superfície radicular com o laser de Nd:YAG

aumentou a biocompatibilidade da raiz, o que pode, então, ser uma alternativa no tratamento da superfície radicular antes do reimplante tardio.

Raldi et al. (2010) avaliaram, por meio de cultivo celular e MEV, a capacidade de adesão de fibroblastos e as alterações estruturais ocorridas na superfície dentinária de reabsorções radiculares externas simuladas de 31 dentes unirradiculares, após tratamento com hidróxido de cálcio, MTA e/ou irradiação com laser de diodo de alta potência e laser Er:YAG. Foram realizadas cavidades padronizadas no terço cervical de cada hemiseção, obtendo-se 62 amostras que foram divididas em nove grupos: grupo 1 - irradiação com laser Er:YAG (42mJ/pulso, 10s, 10Hz e $38\text{J}/\text{cm}^2$); grupo 2 - irradiação com laser de diodo de alta potência (1W, 10s, $796\text{W}/\text{cm}^2$); grupo 3 - preenchimento da cavidade com hidróxido de cálcio e irradiação com laser Er:YAG; grupo 4 - preenchimento da cavidade com hidróxido de cálcio e irradiação com laser de diodo; grupo 5 - preenchimento da cavidade com MTA e irradiação com laser de Er:YAG; grupo 6 - preenchimento da cavidade com MTA e irradiação com laser de diodo; grupo 7 - preenchimento da cavidade com hidróxido de cálcio; grupo 8 - preenchimento da cavidade com MTA e grupo 9 (controle) - nenhum tratamento. Diante dos resultados obtidos, concluiu-se que a irradiação com os lasers Er:YAG e de diodo, nos parâmetros utilizados neste experimento, provocaram alterações morfológicas nas superfícies dentinárias das reabsorções simuladas que favoreceram a adesão celular; o uso do MTA nas reabsorções radiculares simuladas permitiu a adesão celular, enquanto que o hidróxido de cálcio a inibiu, e a associação dos materiais de uso endodôntico com os lasers Er:YAG e de diodo resultou em alterações morfológicas na superfície do MTA, assim como, na do hidróxido de cálcio, que interferiram, de forma discreta, na adesão celular.

Carvalho et al. (2012) avaliaram, por meio da análise histométrica, os efeitos da irradiação com laser de diodo de alta potência em superfícies radiculares de dentes de ratos, reimplantados tardiamente. Os incisivos centrais superiores direitos de 60 ratos Wistar foram extraídos e mantidos em meio ambiente a seco durante sessenta minutos. Por via retrógrada, foi realizada a remoção da papila dental, pulpectomia, preparo e preenchimento dos canais radiculares com pasta de hidróxido de cálcio. De acordo com o tratamento da superfície radicular realizado antes do reimplante, os espécimes foram divididos em quatro grupos (n=15): G1 (controle negativo)- sem tratamento da superfície radicular; G2 (controle positivo)- solução de fluoreto de sódio a 2%; G3 - irradiação com laser diodo de alta potência (810nm, modo contínuo, fibra óptica de 600µm, 1.5W input, 30s) e G4- irradiação com laser diodo com os parâmetros do grupo G3, mas no modo pulsado. Após 15, trinta e sessenta dias do reimplante, os animais foram mortos, e as peças processadas em laboratório. Os grupos irradiados com laser de diodo (G3 e G4) obtiveram as menores médias em porcentagem das áreas de reabsorção radicular, e não diferiram estatisticamente entre si, razão pela qual se conclui que o condicionamento das superfícies radiculares com laser de diodo de alta potência, previamente ao reimplante tardio, reduziu a prevalência de reabsorção radicular externa. No modo contínuo de irradiação (G3), houve a inibição de reabsorção substitutiva e anquilose.

2.2 REGENERAÇÃO DO LIGAMENTO PERIODONTAL

Nos casos de avulsão com reimplantes tardios, o ligamento periodontal é

perdido, e ocorre a exposição de uma superfície desmineralizada que compromete a adesão de células mesenquimais, essenciais para a regeneração do ligamento periodontal. Logo, o tecido conjuntivo periodontal aderido à parede alveolar, após o reimplante, tenderia a formar uma cápsula envolvendo a raiz do dente reimplantado, e a esperada reinserção perpendicular das fibras colágenas sobre a superfície cementária torna-se muito difícil (Lustosa-Pereira et al., 2006).

Sato et al. (2010) investigaram a proliferação, migração e morte das células do ligamento periodontal após o reimplante dental em ratos. Seguidos os procedimentos de exodontia, coloração/marcação e reimplante, os ratos foram mortos após três, cinco ou sete dias com intuito de investigar a proliferação e caracterizar a morte celular, e o período de três semanas para acompanhar a migração celular. Utilizou-se o kit vermelho fluorescente PKH26 para avaliar a migração dessas células aderidas à superfície radicular. As células que sofreram apoptose foram marcadas de marrom escuro pela coloração de TUNEL. As células marcadas positivamente pelo PCNA são as células em proliferação e destacaram-se com maior intensidade próximas à parede óssea alveolar nos períodos iniciais (três e cinco dias após reimplante), comprovando que a regeneração ocorre a partir das células remanescentes do alvéolo, em direção à superfície radicular. Após três semanas, as células marcadas estavam localizadas no meio do espaço periodontal, e nenhuma célula foi marcada sobre a raiz nem sobre o osso alveolar. Isso sugere que a camada superficial das células do ligamento aderido à superfície dos dentes reimplantados prolifera somente no meio, e não se dispersa totalmente durante o reparo periodontal após o reimplante. Os resultados desse estudo sugerem que tanto a proliferação quanto a morte celular ocorrem no ligamento periodontal após o reimplante visando a manutenção de um espaço regular.

Uma das primeiras tentativas de se promover o reparo periodontal dos dentes avulsionados foi proposta por Lam & Sae-Lim em 2004. Neste estudo, os autores avaliaram o efeito do gel Emdogain (derivado da matriz de esmalte) sobre dentes de macacos avulsionados e reimplantados após serem mantidos em ambiente seco por uma hora. O grupo C (remoção do ligamento periodontal com pedra pomes e reimplante tardio) teve a maior ocorrência de reabsorção substitutiva e a menor incidência de completo reparo periodontal. Os grupos D, E e F, que receberam aplicação do Emdogain gel na superfície radicular com ou sem a remoção do ligamento periodontal (pedra pomes) e em conjunção com o condicionamento da superfície radicular externa antes do reimplante, também apresentaram reparo periodontal desfavorável, com reabsorção inflamatória e substitutiva atingindo mais de 70%. Assim, pôde-se concluir que o Emdogain apresentou limitado efeito indutor sobre as células remanescentes do ligamento periodontal da parede alveolar, embora isso pudesse ser diferente se o ambiente local da superfície radicular pudesse ser modulado com hidróxido de cálcio para intensificar a ação terapêutica da proteína da matriz de esmalte na regulação da regeneração periodontal, ao invés de ter obturado os canais previamente com guta percha.

O termo regeneração é definido como a reconstrução da perda de tecidos injuriados de modo que as estruturas originais e sua função sejam completamente restaurados, e envolve uma cadeia de eventos biológicos que inclui o recrutamento (migração) de células do tecido conjuntivo do ligamento periodontal para o sítio a ser cicatrizado (superfície radicular), a adesão dessas células, seguida de proliferação e diferenciação em outras células (osteoblastos e cementoblastos) e a síntese de componentes do tecido conjuntivo, de forma a promover a reinserção de fibras de colágeno no cimento e osso alveolar neoformados (Bartold & Raben, 1996;

Murakami, 2011; Ramseier et al., 2012). Esse processo é coordenado por mediadores das próprias células envolvidas no processo de reparação (macrófagos, leucócitos, linfócitos e fibroblastos). Devido ao envolvimento de uma grande variedade de células neste processo, uma complexa interação entre estas é mediada pela liberação local de citocinas (Bartold & Raben, 1996).

Vários estudos têm investigado a ação de citocinas recombinantes associadas ou não a outras substâncias biomodificadoras ou bioestimuladoras na terapia de regeneração periodontal. Dentre elas, destacam-se as seguintes: o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento transformador beta (β TGF), a proteína óssea morfogenética (BMP), o fator de crescimento de insulina (IGF) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (Nevins et al., 2003; Miyaji et al., 2010; Kitamura et al., 2011; Murakami, 2011).

Os FGFs são encontrados em diversos tecidos do organismo (conjuntivo, periodontal, ósseo), unindo-se aos mesmos receptores, atuando como quimiotáticos e coordenando a mitose de células endoteliais e de uma variedade de células mesenquimais, com a inclusão de fibroblastos, osteoblastos, condrócitos e células musculares lisas (Callens, 1997).

Estudos prévios têm demonstrado que as soluções puras de FGF in vivo perdem rapidamente a sua atividade biológica funcional, principalmente devido à perda por difusão e/ou à inativação/degradação enzimática. Contrariamente, quando os FGFs são absorvidos ou encapsulados com outros materiais, o risco de degradação é minimizado, com a garantia da sua atividade biológica. Esses veículos podem ser na forma de hidrogel, matrizes porosas de polímeros sintéticos ou naturais ou nano e micropartículas (Yun et al., 2010).

Takayama et al. (2001) observaram o efeito tópico da aplicação de FGF-2 em

defeitos II criados cirurgicamente em macacos machos. Em um grupo, utilizou-se somente o carreador/veículo; no segundo e no terceiro grupo aplicou-se sobre os defeitos um veículo gelatinoso (hidrogel biodegradável) contendo 0,1% FGF-2 e 0,4% de FGF-2, respectivamente; no grupo controle os defeitos não receberam nenhum tipo de tratamento. Os animais foram sacrificados após oito semanas e analisados histologicamente. Os resultados mostraram que, nos sítios tratados com FGF-2, houve significativa regeneração periodontal (principalmente o grupo com 0,4% FGF-2) em relação ao grupo controle, o que comprova a importância da associação de uma matriz gelatinosa como carreador dos FGF. Não foram visualizadas reabsorções radiculares, anquilose e diminuição do crescimento epitelial nas áreas tratadas com o FGF-2 recombinante.

Murakami et al. (2003) avaliaram o efeito da utilização do 0,1% de FGF (30µg/site) associado a uma matriz gelatinosa como veículo, ou apenas o uso da matriz Gelatinosa sobre defeitos classe II criados na furca de cães beagle. Os autores constataram que a aplicação tópica de FGF-2 em defeitos ósseos induzidos em cães, além de estimular a neoformação óssea do ligamento periodontal e do cemento, inibiu a recessão do epitélio gengival e o desenvolvimento de reabsorção radicular e anquilose. Ademais, nas superfícies tratadas apenas com a matriz gelatinosa não observaram tal neoformação.

Posteriormente, em um estudo duplamente randomizado em 253 pacientes com doença periodontal, os autores verificaram que a porcentagem da formação óssea foi significativamente superior em todas as concentrações de FGF-2 testadas (0.2%, 0.3% e 0,4 %), quando comparadas com o grupo que só recebeu o veículo. Segundo os autores, os resultados desse estudo sugerem fortemente que a aplicação tópica de FGF-2 pode ser eficaz na regeneração do tecido periodontal

humano que foi destruído através da periodontite (Kitamura et al., 2011).

Com o desenvolvimento da terapia de regeneração periodontal, surge uma nova perspectiva para o tratamento dos dentes avulsionados (Wang et al., 2010; Assunção et al., 2011). Poucos estudos, contudo, avaliaram a ação de fatores de crescimento de fibroblastos no reparo periodontal de dentes reimplantados.

Sae-Lim et al. (2004) realizaram um estudo com o intuito de avaliar histologicamente o efeito do FGF-b no processo de reparo após o reimplante de dentes de macacos. Os dentes foram reimplantados após uma hora expostos ao ambiente seco, sendo o alvéolo preenchido com 0.1ml de Solução de FGF-b recombinante (400µg/ml) com ou sem cola de fibrina. No grupo controle negativo, os dentes foram reimplantados imediatamente e como grupo controle positivo, dez dentes ficaram uma hora a seco e reimplantados sem tratamento da superfície radicular. Concluíram que, embora estatisticamente insignificante, a aplicação tópica do FGF-b associado a matriz de fibrina melhorou a ocorrência de reparo completo e regeneração periodontal.

Sato et al. (2004) examinaram os efeitos do FGF-2 na regeneração do cimento e do ligamento periodontal em cavidades simuladas na superfície radicular de dentes de cães beagle. Após raspagem, remoção de placa, preparo e obturação do canal radicular, foram extraídos molares superiores e inferiores. Utilizaram-se brocas para realização de cavidades de 3mm no terço médio das raízes, seguido da irrigação com solução salina. Antes do reimplante, foi aplicado sobre a superfície radicular desses dentes 25µl de gel de colágeno contendo 0,1; 1,0; ou 5,0µg de FGFb recombinante humano ou apenas o veículo isoladamente. A análise histológica revelou que após quatro semanas havia fibras esparsas aderidas ao cimento, mas, após oito semanas foi demonstrado que a adição de FGFb nas

concentrações utilizadas intensificaram a neoformação de cimento e aumentou o número de fibras aderidas, com a indicação de que houve uma intensificação da regeneração periodontal.

Seshima et al. (2010) avaliaram o efeito do fator de crescimento de fibroblasto recombinante (FGF2) sobre dentes reimplantados. Foram reimplantados pré - molares de dez cães. As raízes foram divididas em segmentos A – terço médio cervical (raspagem do ligamento periodontal com curetas) e B – terço médio apical (Sem remoção do LP, apenas irrigação com solução salina). Os dentes do lado esquerdo da mandíbula (grupo experimental) receberam aplicação de FGF-2 + matriz de Hidroxipropilcelulose antes do reimplante, enquanto nos dentes do lado direito da mandíbula (grupo controle) não receberam tratamento da superfície radicular. Após duas, quatro ou oito semanas, os animais foram mortos e os espécimes coletados e processados para avaliação histopatológica. Os resultados mostraram que o FGF2 promoveu a formação de novo ligamento periodontal, preveniu a anquilose e a reabsorção radicular.

Assunção et al. (2011) testaram o potencial regenerativo de alguns produtos biológicos sobre os tecidos periodontais posterior ao reimplante de dentes de cães. Após extração, os dentes ficaram trinta minutos e foram reimplantados envolvidos com os seguintes materiais: Nenhum (controle); PPP (Plasma pobre em plaqueta); PRP/Ca (Plasma rico em plaqueta ativado por cloreto de cálcio); PRP/Thr/Ca (Plasma rico em plaqueta ativado por cálcio e trombina); BMMCs/PRP/Ca (Célula mononuclear da medula óssea ativada por cálcio). Após 120 dias do reimplante, as análises histológicas, histomorfométrica e imuno-histoquímica sugeriram que as plaquetas ativadas com Trombina tiveram um papel importante na redução de reabsorção substitutiva, além de favorecer um reparo tecidual, devido à presença de

grandes concentrações de fatores de crescimento. Entretanto, sugerem novos estudos para testar outros materiais, uma vez que PRP/Ca não representou uma matriz adequada para as células indiferenciadas no tratamento dos dentes avulsionados.

Zhou et al. (2012) avaliaram a regeneração do ligamento periodontal após a aplicação de camadas celulares fabricadas por uma técnica comum de cultura sobre dentes de cães avulsionados. Após tratamento endodôntico, as raízes foram envolvidas com as camadas celulares produzidas pela cultura de fibroblastos provenientes de ligamento periodontal autólogo e reimplantadas (grupo experimental), diferindo do grupo controle que não recebeu tais camadas celulares antes do reimplante. Os animais foram sacrificados após oito semanas e analisados histologicamente. O grupo experimental apresentou uma maior ocorrência de reparo periodontal favorável (88,4%) do que o grupo controle (5,3%). A regeneração do cemento e ligamento periodontal foi observada no grupo experimental, e os tecidos regenerados apresentaram alta expressão de colágeno tipo I, tipo III e de fibronectina.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de reabsorções radiculares externas e o reparo periodontal em dentes de ratos reimplantados tardiamente, após condicionamento das superfícies radiculares com laser diodo de alta potência, associado ou não à utilização do fator básico de crescimento de fibroblasto.

4 METODOLOGIA

4.1 MODELO EXPERIMENTAL

Foram utilizados incisivos superiores direitos de cinquenta ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da raça Wistar, com dez semanas de idade e peso corporal entre 250 e 300g. Os animais foram mantidos em gaiolas identificadas de acordo com o grupo experimental, em temperatura ambiente, alimentados com água e ração *ad libitum* fornecidos pelo biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos- UNESP.

Esta pesquisa foi realizada de acordo com os princípios éticos para experimentação em animal e foi aprovado pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da UNITAU (protocolo CEUA/UNITAU 004/11) (Anexo A).

4.2 INTERVENÇÃO CIRÚRGICA

Os animais foram anestesiados com uma associação de cloridrato de xilazina (Anasedan-Agribands do Brasil Ltda, Paulínia, SP, Brasil) e cloridrato de ketamina base (Dopalena-Agribands do Brasil Ltda, Paulínia-SP, Brasil) por via peritoneal. A dose de ketamina foi de 25mg/kg de peso e de xilazina de 10mg/kg de peso (Carvalho et al., 2012). O peso corporal dos ratos variou em torno de 250 a 300 g. Assim, a quantidade de ketamina variou de 6,25 a 7,5mg e a de xilazina entre 2,5 a

3mg. A anestesia foi realizada com o auxílio de uma seringa descartável para insulina.

Após a anestesia, foi realizada a antissepsia da porção anterior da maxila com Chlorohex (solução de clorexidina a 2%- Ceras Johnson Ltda, Jacarepaguá-RJ, Brasi), sindesmotomia, luxação e extração do incisivo superior direito, simulando uma avulsão dentária. Para o procedimento de sindesmotomia e luxação, foi utilizada uma lâmina de bisturi 11, e para extração dentária foi utilizado o porta agulha Mathieu (Wilcos do Brasil Indústria e Comércio Ltda., Petrópolis-RJ, Brasil) (Figuras 1a e 1b).

Após a extração dos dentes, cada animal recebeu uma identificação na cauda, para que, posteriormente, os dentes pudessem ser reimplantados em seus respectivos alvéolos (Figura 1c). Com a finalidade de potencializar o efeito anestésico e reduzir a sintomatologia dolorosa durante e após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram medicados com 0,02 ml de cloridrato de tramadol (Tramal®) diluídos em água, 24 horas antes e após o experimento.

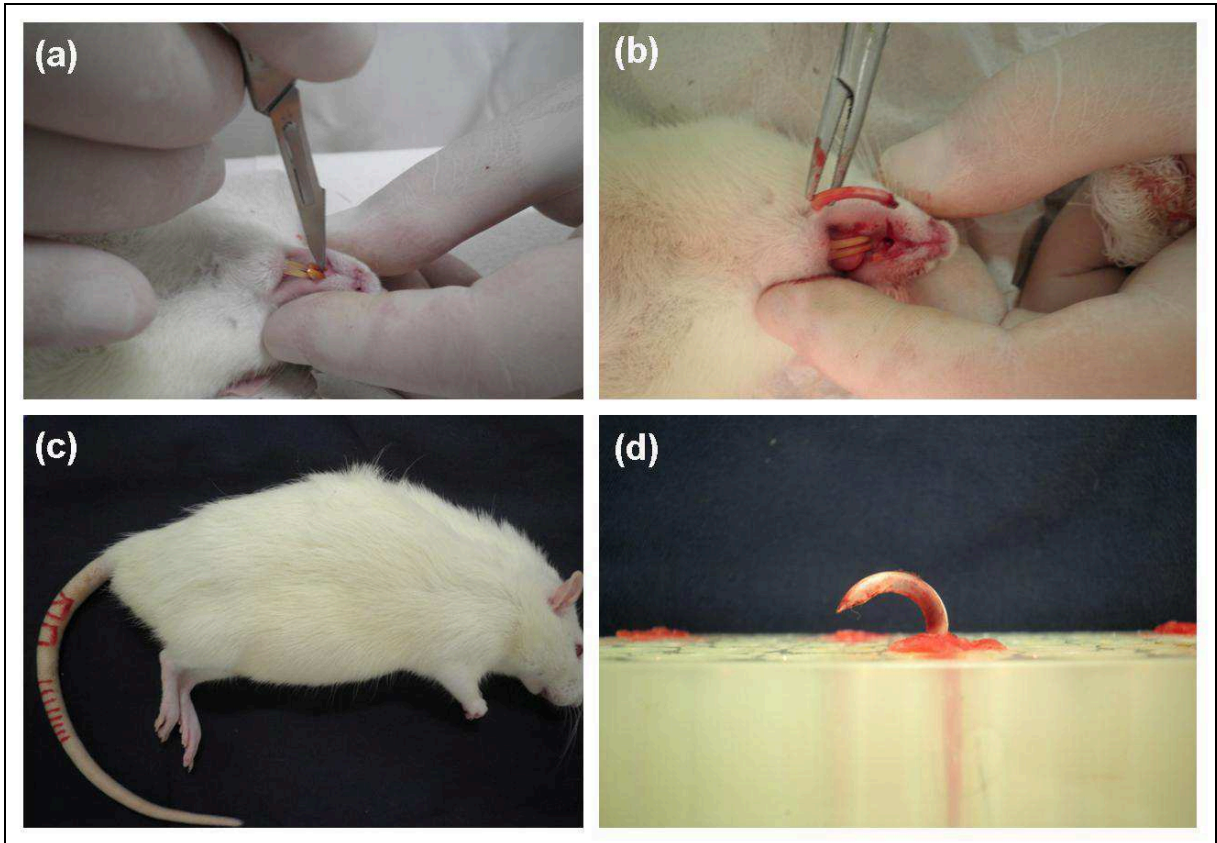


Figura 1 – Procedimento de exodontia: (a) sindesmotomia; (b) extração com porta agulha de Mathieu; (c) animal identificado pela cauda; (d) dente extraído e exposto ao meio ambiente

4.3 DIVISÃO DOS GRUPOS

O cálculo amostral foi embasado em estudos da literatura, sugerindo um $n=10$ amostras.

Desta forma, os cinquenta espécimes foram aleatoriamente divididos em cinco grupos com dez animais cada, a saber:

Grupo 1 (C+) - após a exodontia, foi realizada a irrigação do alvéolo com soro, e, em seguida, os dentes foram reimplantados imediatamente com os remanescentes do ligamento periodontal (controle positivo).

Grupo 2 (C-) - os dentes extraídos permaneceram expostos em meio

ambiente a seco, presos através de suas coroas em uma lâmina de cera rosa nº 7, por um tempo de sessenta minutos, simulando a condição de reimplante tardio (Figura 1d). Após este período, os dentes foram reimplantados sem irradiação da superfície radicular externa e sem nenhum tipo de tratamento para reparação periodontal (controle negativo).

Grupo 3 (LA / Laser de alta potência) - os dentes extraídos permaneceram expostos no mesmo ambiente a seco por um tempo de sessenta minutos. Decorrido esse período, as papilas dentárias foram excisionadas com uma lâmina de bisturi nº 11 para a exposição do canal radicular e a polpa removida via retrógrada, com limas Flexofile #15 (Figura 2a)(Dentsply-Maillefer Instruments S.A., Ballaigues-Suíça), ligeiramente pré-curvadas. Os canais radiculares foram preparados com limas Flexofile #20 e 25 e solução de hipoclorito de sódio a 1% (Famácia Fórmula & Ação, São Paulo-SP), e, posteriormente, irrigados com solução de EDTA-T (Famácia Fórmula & Ação, São Paulo-SP) por três minutos, aspirados com cânula 30x4 e secos com cones de papel absorvente esterilizados. Em seguida, os canais radiculares foram preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio veiculada em polietilenoglicol (Calen – S.S White Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) (Figura 2b). Os espécimes receberam tratamento da superfície radicular externa irradiados com laser de diodo de alta potência (Tera Surgery -protótipo- da DMC equipamentos Ltda, São Carlos -Brasil) com comprimento de onda de 810nm, no modo contínuo, fibra óptica de quartzo de 600µm, feixe de luz guia de diodo vermelho de 650nm, 1,5W de potência input (monitor). A irradiação foi realizada com movimentos de varredura, com a fibra óptica posicionada na angulação de 45^o em contato com a superfície radicular, por um tempo de trinta segundos, sendo dez segundos para as faces proximais e cinco segundos para as faces vestibular e

lingual, totalizando 45J de energia dispensada (Carvalho et al., 2012) (Figuras 2c , 2d e 3).

Grupo 4 (FGF) - os canais radiculares foram preparados e preenchidos com a pasta de hidróxido de cálcio da mesma forma que no grupo anterior. Como estimulador da regeneração periodontal, foi utilizado o fator de crescimento de fibroblastos 50µg FGF-2 gel (Peprotech INC, Rocky Hill, NJ, USA) na concentração de 0,2% em gel de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) a 3% (Farmácia de manipulação Terapêutica, São José dos Campos- SP, Brasil) (Figura 4a). Foi aplicado o gel na superfície radicular palatina e no interior do alvéolo dental de cada espécime (Figuras 4b, 4c e 4d).

Grupo 5 (LA + FGF) - os espécimes receberam preparo dos canais radiculares e tratamento de superfície radicular com laser diodo de alta potência com os mesmos parâmetros do grupo 3. Em seguida, para o tratamento da regeneração periodontal, foi aplicado na superfície lingual e no alvéolo o fator de crescimento de fibroblastos 50µg FGF-2 gel + gel de HPMC da mesma forma que no grupo 4.

Vale ressaltar que após o preparo dos canais radiculares e antes dos respectivos tratamentos da superfície radicular, o ligamento periodontal aderido à raiz foi removido pela fricção com uma gaze embebida em hipoclorito de sódio a 1% e, em seguida, lavada com solução salina.

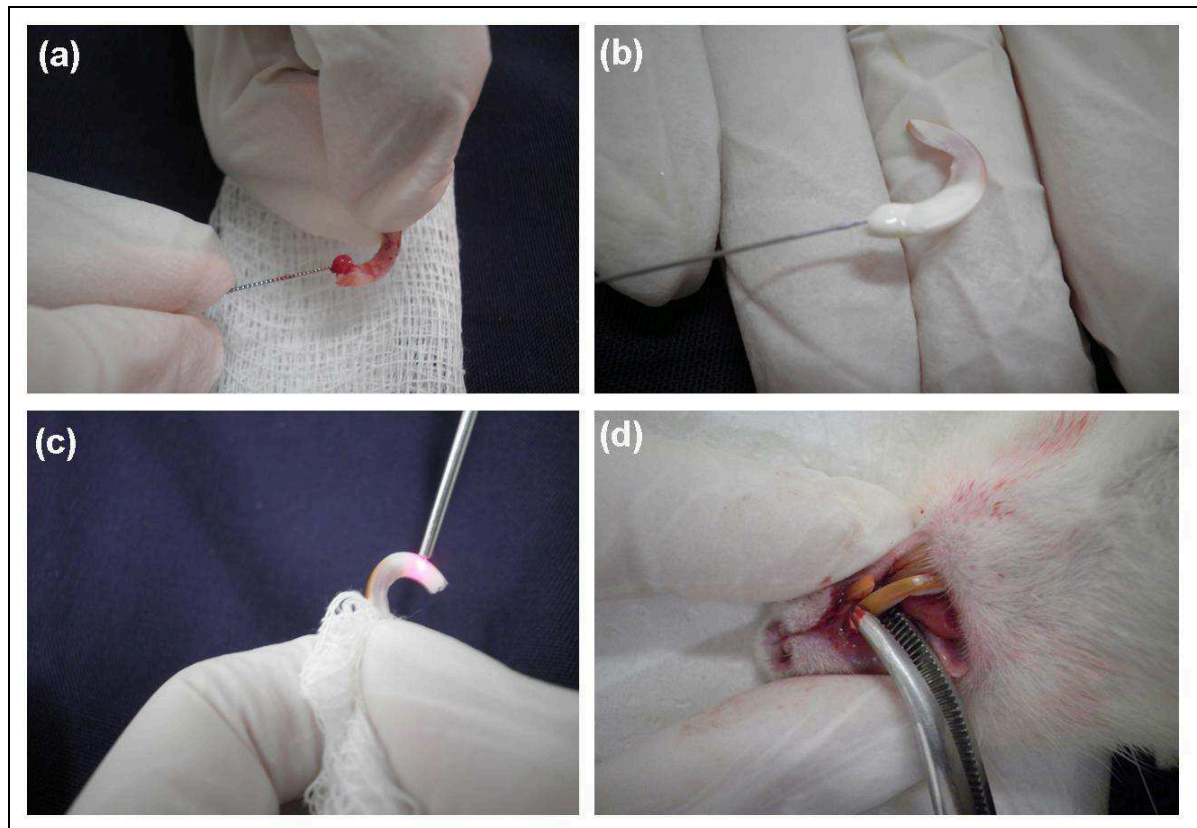


Figura 2 - Preparo do dente e reimplante: (a) remoção da polpa dental; (b) preenchimento do canal radicular com pasta de hidróxido de cálcio e polietilenoglicol; (c) irradiação da superfície radicular; (d) reimplante dental

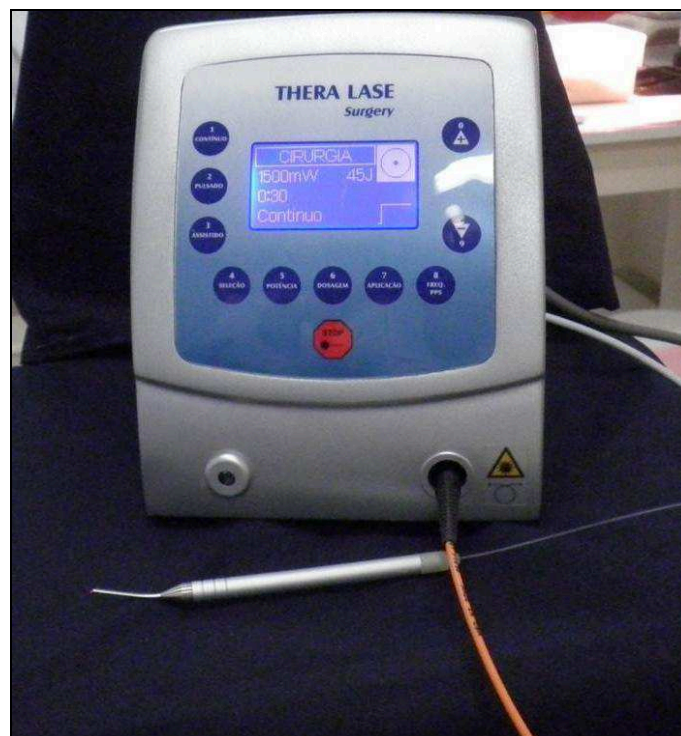


Figura 3 - Equipamento Laser de Diodo de alta potência utilizado para irradiação da superfície radicular nos grupos LA e LA+FGF

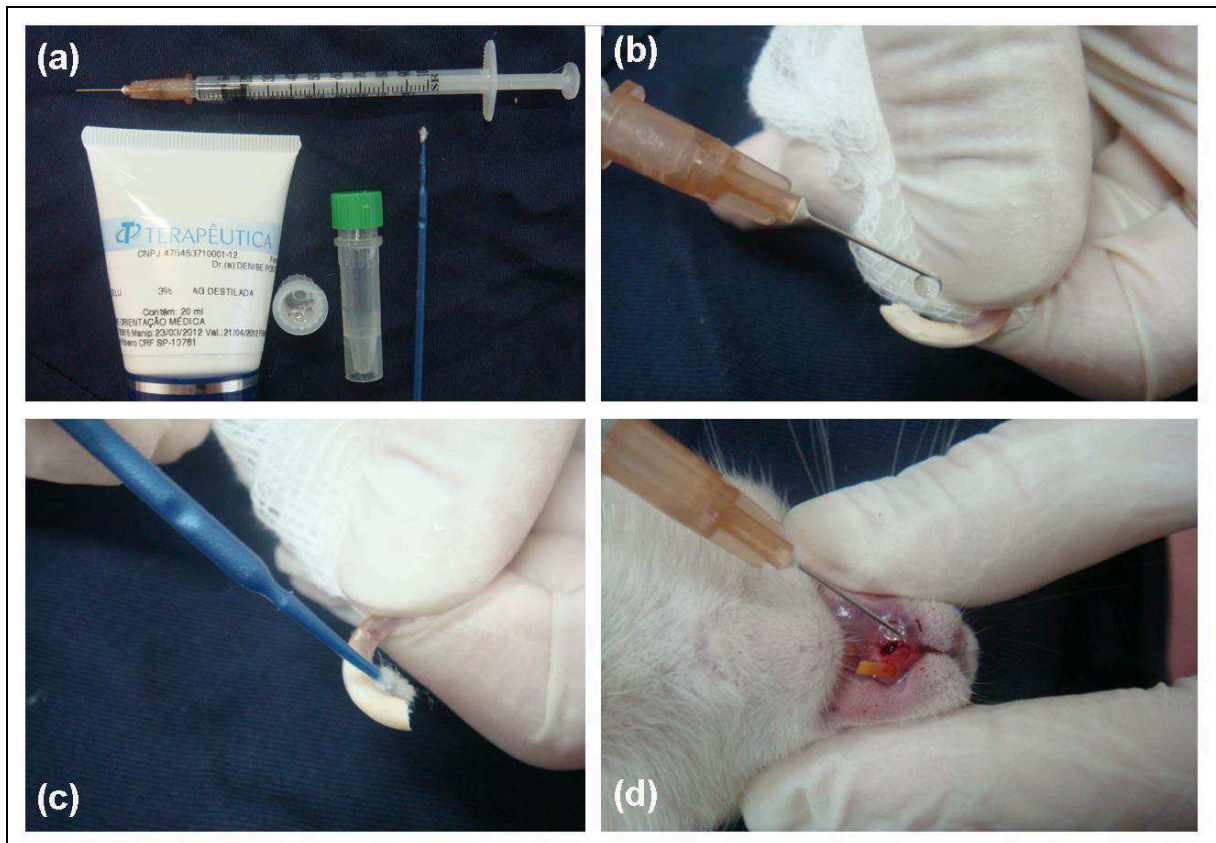


Figura 4 - Tratamento para indução da regeneração periodontal: (a) fator de crescimento de fibroblasto utilizado (FGF-2); (b) e (c) aplicação do FGF-2 na superfície radicular; (d) aplicação do FGF-2 no alvéolo

4.4 REIMPLANTE DOS DENTES

Após os tratamentos realizados, os alvéolos dos animais foram irrigados com solução fisiológica e, com o auxílio de uma pinça hemostática curva, os dentes foram reimplantados em seus respectivos alvéolos.

Nenhum tipo de contenção foi utilizado e todos os animais receberam dose única de 24.000U.I. de Pentabiótico pequeno porte (Benzilpenicilina benzatina- 12.000 UI Benzilpenicilina procaína- 6.000 UI, Benzilpenicilina potássica- 6.000UI, Sulfato de Diidroestreptomicina- 5mg, Sulfato de Estreptomicina- 5mg) (Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil), por via intramuscular.

Nas primeiras doze horas pré e pós-operatórias, os animais receberam apenas água. Após, a alimentação foi com ração triturada por um período de 15 dias.

4.5 ANÁLISE RADIOGRÁFICA

Após o período de sessenta dias, os animais foram anestesiados e eutanasiados por superdose de anestésico. A maxila foi separada da mandíbula, em seguida foi realizada uma incisão mediana no palato (lâmina de bisturi nº 15) e um corte com uma tesoura próxima da face distal de molares, o que possibilitou a obtenção da peça com o incisivo superior direito.

Para a obtenção das imagens radiográficas, foi utilizado o aparelho de raios X Spectro 70x Seletronic (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil), operando com 70kVp e 8mA. A distância foco-filme foi de 20cm, com incidência perpendicular ao plano filme. O tempo de exposição em 0,25s foi selecionado baseado em estudo piloto.

As imagens foram obtidas com o sistema de radiografia digital direta Kodak RVG 6100 por meio do sensor de RVG nº 1, com área ativa de 30X40mm.

Sobre cada placa óptica eram colocadas as duas hemimaxilas de cada animal, sendo uma com o dente reimplantado e a outra com o dente homólogo normal.

Para a padronização das imagens digitais, um dispositivo permitiu a fixação do sensor sempre numa mesma posição, assim como o controle da distância e do ângulo de incidência dos raios X (Figura5).

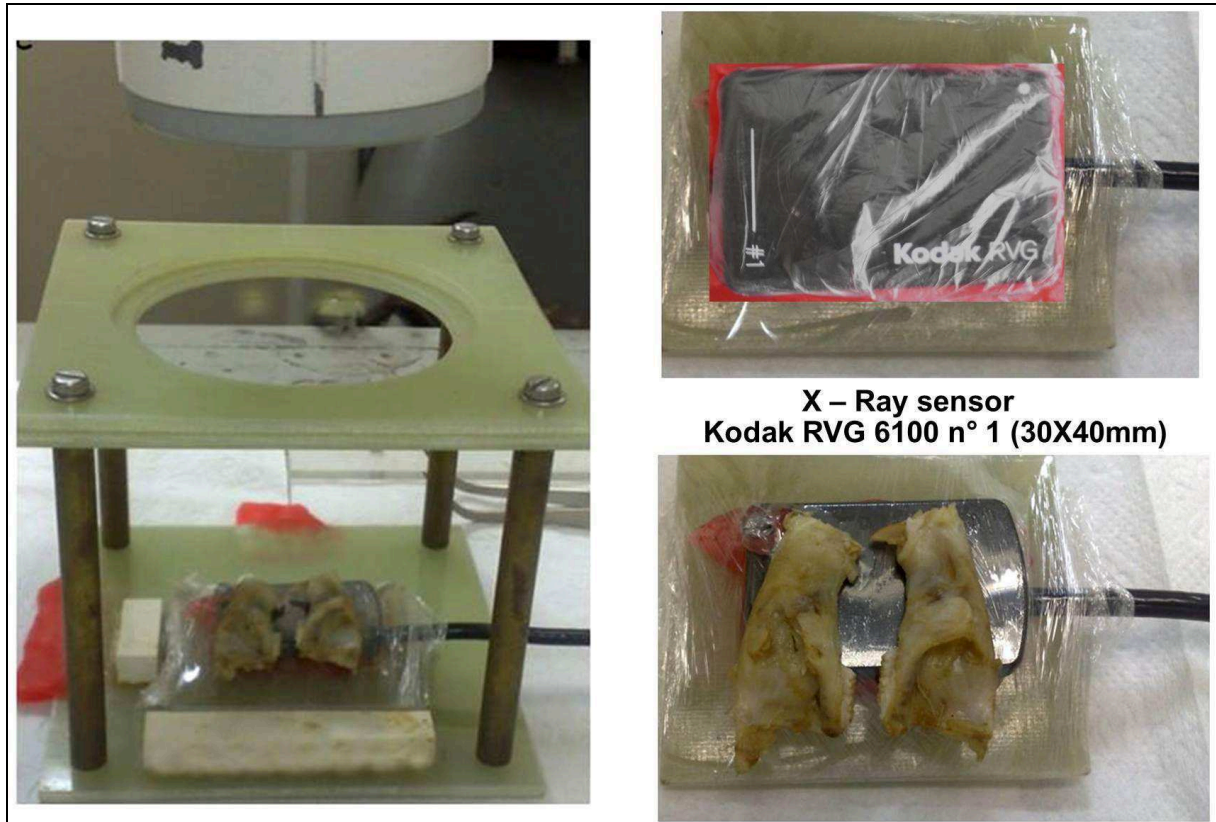


Figura 5 - Padronização das tomadas radiográficas: dispositivo para controle da distância e do ângulo de incidência, fixação do sensor e peças contendo o dente reimplantado e o homólogo posicionados sobre o sensor

Após a digitalização, realizou-se a padronização do contraste e brilho das imagens com *software* sistema de imageologia intraoral Kodak RVG 6100 e estas foram arquivadas no formato TIF.

Em seguida, as imagens foram analisadas no programa Image-Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA). Com o auxílio desse programa, para cada espécime, foram demarcados o número de áreas de reabsorção e a porcentagem dessas áreas com relação à área total do dente (Figuras 6a e 6b).

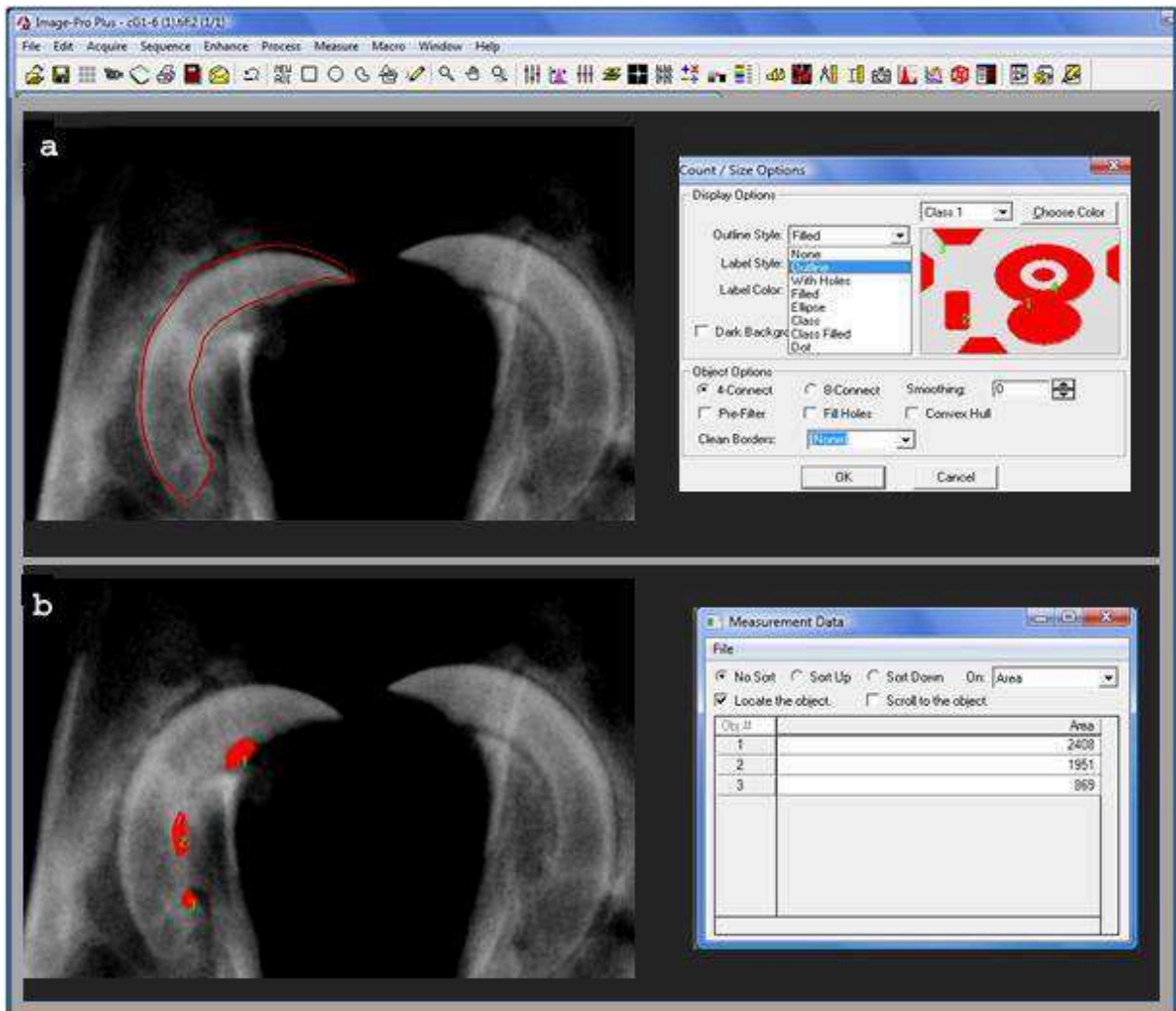


Figura 6 – Cálculo das áreas de reabsorção externa (em mm^2) com o programa Image-Pro Plus 7.0: (a) delimitação e determinação da área total do espécime (opção *outline*); (b) delimitação e cálculo de todas as áreas de reabsorção (opção *filled*)

Os dados foram exportados para o programa Excel, e, para cada espécime, foram calculadas as porcentagens de reabsorção radicular em relação à área total do dente.

Por fim, foram determinadas as médias do número de focos de reabsorção e da porcentagem das áreas de reabsorção radicular para cada grupo experimental.

4.6 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

As peças obtidas foram fixadas em formol 10% por sete dias. Após, foram lavadas por 24h em água corrente e desmineralizadas em solução de 100g EDTA (ácido etileno diamino tetracético), 10g de hidróxido de sódio P.A. e água destilada em quantidade suficiente para completar um litro. Esta solução de EDTA a 10% foi trocada a cada três dias, até que uma agulha fina pudesse ser introduzida no dente sem algum tipo de resistência. Em seguida, as peças foram submetidas ao processamento histotécnico, incluídas em parafina e por meio de um micrótomo rotativo (modelo 297, ANCAP, São Paulo, SP-Brasil) foram realizados cortes seriados no sentido longitudinal (vestíbulo lingual) com 6µm de espessura até que se esgotasse o bloco de parafina. As lâminas então produzidas recebiam de forma intercalada as colorações pela técnica da Hematoxilina e Eosina (H. E.), e a outra parte corada com o Picrosirius red (Direct red 80- Sigma-Aldrich - Brasil Ltda, São Paulo, SP- Brasil) para a análise quantitativa das fibras colágenas.

4.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA

4.7.1 ANÁLISE DESCRITIVA DOS EVENTOS HISTOLÓGICOS

A análise histológica foi realizada com auxílio de microscópio de luz (microscópio óptico binocular Axiostar Plus, Carl Zeiss, Zena- Alemanha), onde somente a face lingual da raiz foi considerada para tal análise, pois o dente do rato apresenta a quantidade mais representativa de ligamento periodontal nesta face.

Para cada espécime, foram analisados dez cortes histológicos corados com HE, e se observou no aumento de cinquenta vezes a presença dos seguintes eventos histológicos:

Reabsorção Inflamatória - lacuna de reabsorção na superfície radicular com presença de células inflamatórias na área.

Reabsorção Substitutiva -**lacuna de reabsorção na superfície radicular associada à substituição por tecido ósseo**. Anquilose - áreas com ausência do espaço periodontal, em que foi apresentado o contato direto entre a superfície radicular e o tecido ósseo adjacente.

4.7.2 ANÁLISE DOS EVENTOS HISTOLÓGICOS POR MEIO DE ESCORES

A ocorrência de reabsorções inflamatórias, substitutivas e anquilose foi analisada por terços e registrada numa tabela, onde foram então atribuídos os seguintes escores:

Escore 0 = Ausente

Escore 1 = Presença Leve - até 1/3 (33%)

Escore 2 = Presença Moderada - de 1/3 a 2/3 (33 a 66%)

Escore 3 = Presença Severa – mais que 2/3 (>66%)

Para a análise do processo de reparo periodontal foram avaliadas as características do tecido conjuntivo formado no espaço periodontal e a reinserção das fibras periodontais à superfície radicular externa. Foram estabelecidos, também, escores de acordo com as características encontradas.

Para a análise das características do **Tecido Conjuntivo** foram considerados:

Escore 0 – tecido conjuntivo ausente

Escore 1 - Para tecido conjuntivo Delgado/ Desorganizado

Escore 2 – Presença de tecido conjuntivo Espesso/Organizado;

Quanto à **Reinserção das fibras do ligamento periodontal (LP)** considerou-se:

Escore 0 - Fibras do LP ausentes

Escore 1 – Fibras do LP não inseridas ao cimento

Escore 2 - Fibras do LP reinseridas ao cimento

Todas essas análises foram executadas pelo mesmo examinador devidamente treinado, que desconhecia a qual grupo os cortes histológicos pertenciam.

4.7.3 ANÁLISE QUANTITATIVA DAS FIBRAS COLÁGENAS

Para uma parte das lâminas foi utilizada a coloração pelo Picrosirius Red (totalizando cinco cortes histológicos mais representativos), com a finalidade de avaliar a porcentagem das fibras colágenas espessas presentes no ligamento periodontal dos referidos cortes.

Cada corte foi analisado sob microscopia de polarização, com a utilização de aumento de quatrocentas vezes, em campos referentes aos terços cervical, médio e apical, as imagens digitais foram salvas imagens digitais de maneira que toda a extensão do ligamento periodontal fosse fotografada, no formato JPEG para posterior leitura no programa Image- Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA).

Com o Image Pro Plus, a área de cada imagem foi medida automaticamente por diferencial colorimétrico. O analisador fornece ao sistema o padrão de cor a ser quantificado, e o sistema identifica a cor, preenche a área de interesse e processa a mensuração (Figuras 7, 8 e 9).

Os dados foram exportados para o programa Excel e, para cada corte, foram calculadas as porcentagens das fibras colágenas naquela determinada área. As médias das porcentagens de todos os dentes de cada grupo foram então calculadas.

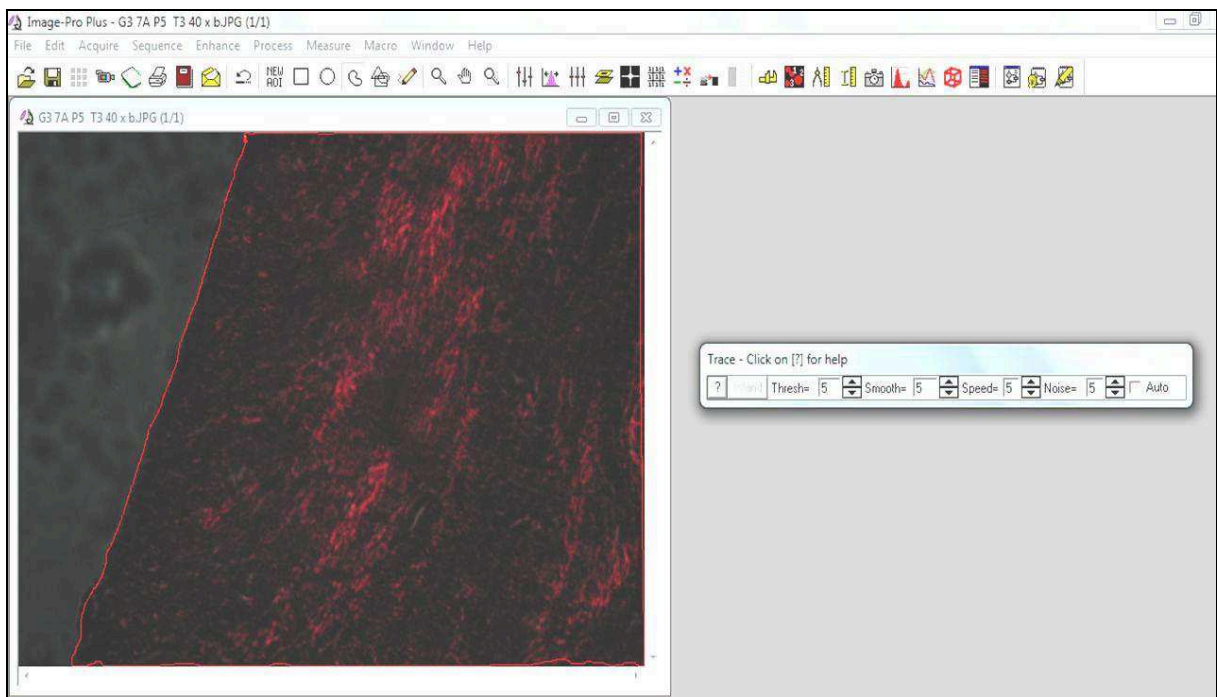


Figura 7 – Foto representativa do sistema de análise de imagens, demonstrando um campo microscópico contendo fibras colágenas polarizadas, utilizando objetiva de 40X (Programa Image-Pro Plus 7.0)

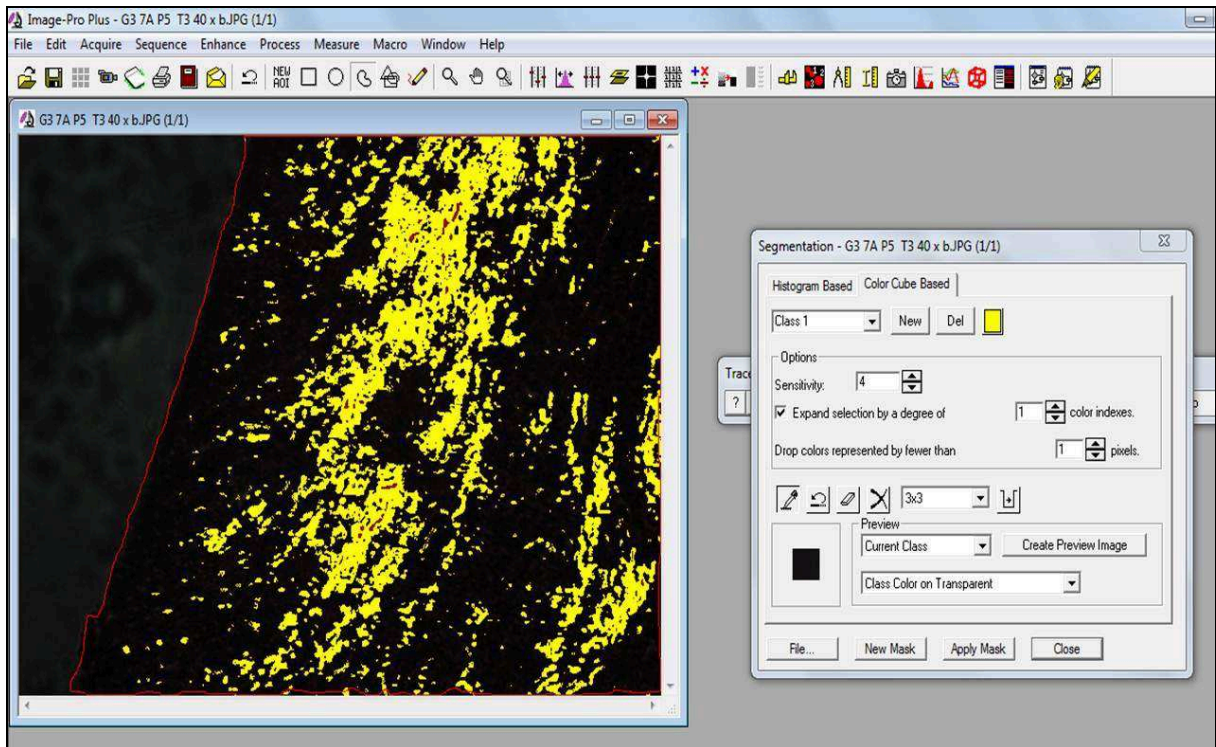


Figura 8- Foto representativa do sistema de análise de imagens, onde a área contendo fibras colágenas do tipo I foi preenchida em amarelo para ser quantificada pelo sistema

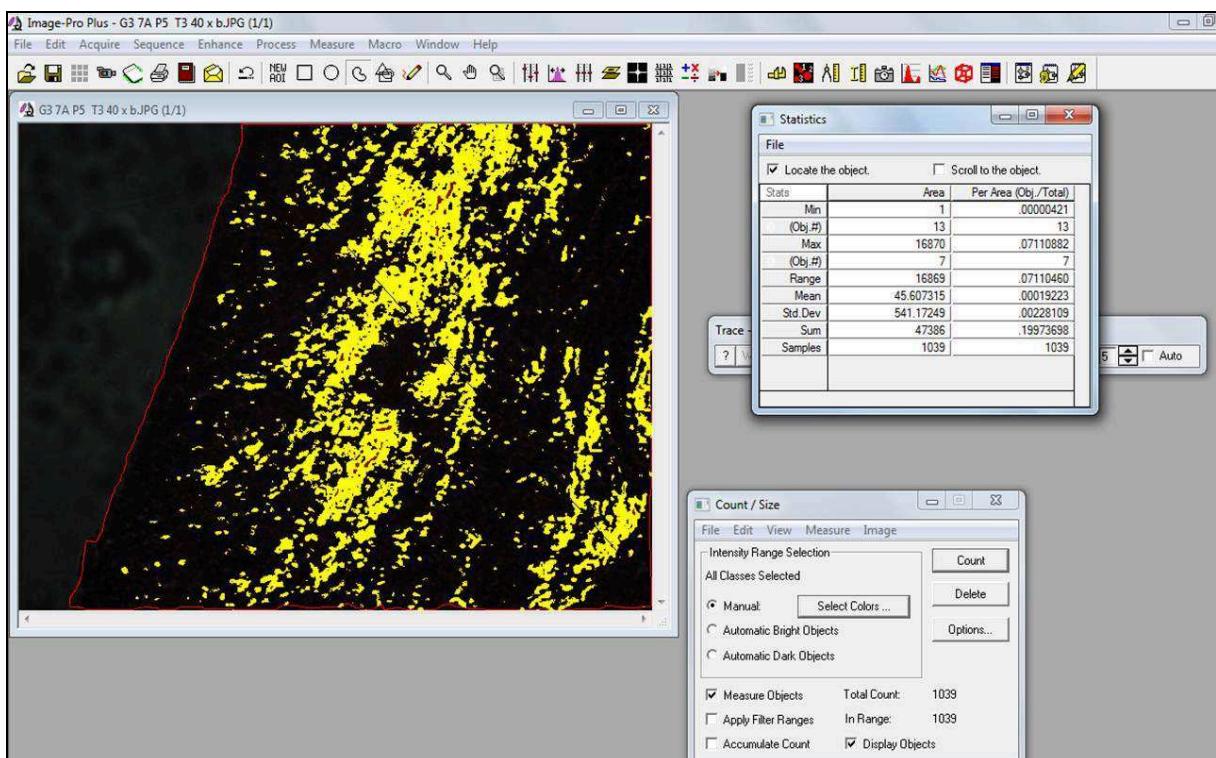


Figura 9 - Foto representativa do sistema de análise de imagens, processando a mensuração da área ocupada por fibras colágenas do tipo I

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise radiográfica, para a comparação do valor das médias (percentuais) das áreas de reabsorção entre os grupos experimentais e controles foi utilizado o teste estatístico de Kruskal-Wallis com nível de significância de 5%. Para a comparação do valor das médias dos números das áreas de reabsorção entre os grupos, foi utilizado o teste ANOVA, com nível de significância de 5%.

Para a análise dos eventos histológicos por meio de escores, bem como para a comparação do valor das médias de fibras colágenas coradas pelo método de coloração Picrosírius Red, o teste estatístico utilizado foi o de Kruskal-Wallis com nível de significância de 5%. Quando este teste indicou diferença estatisticamente significativa, o teste de Dunn foi utilizado para comparações individuais.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE RADIOGRÁFICA

Os resultados da porcentagem e do número de áreas de reabsorção radicular de cada espécime com suas respectivas médias e desvio padrão nos diferentes grupos experimentais e controles, estão expressos na tabela 1.

As comparações dos valores das médias (%) das reabsorções radiculares entre os grupos estão expressos na figura 10.

A comparação do valor das médias dos números das áreas de reabsorção entre os grupos experimentais e grupos controles estão expressos na figura 11.

Os dados originais desses testes estatísticos estão representados nos apêndices A e B.

Tabela 1 – Resultados das porcentagens e números das áreas de reabsorção radicular e desvio padrão nos diferentes grupos experimentais e controles

Dente	C ⁺		C ⁻		LA		FGF		LA + FGF	
	% área	N ^o de áreas	% área	N ^o de áreas	% área	N ^o de áreas	% área	N ^o de áreas	% área	N ^o de áreas
1	0,64	1	3,33	3	1,16	4	5,06	3	0,41	1
2	1,11	3	1,24	2	1,50	3	4,7	3	1,09	2
3	0,74	2	6,95	5	0,84	1	1,06	2	0,57	1
4	3,80	3	1,83	4	3,48	1	4,39	4	0,77	1
5	0,46	1	1,92	6	1,30	1	5,98	2	1,53	1
6	0,47	2	4,45	5	0,00	0	2,78	2	1,2	2
7	0,94	2	9,14	3	1,19	3	3,47	4	0,8	2
8	0,00	0	2,70	4	1,07	2	0,73	2	1,35	2
9	1,13	3	1,15	3	0,80	1	1,31	2	1,08	2
10	1,02	2	5,59	5	0,30	1	1,46	2	1,05	1
Média	1,03	1,89	3,83	4	1,16	1,70	3,09	2,6	0,99	1,5
DV	1,03	0,99	2,68	1,25	0,93	1,25	1,89	0,84	0,35	0,53

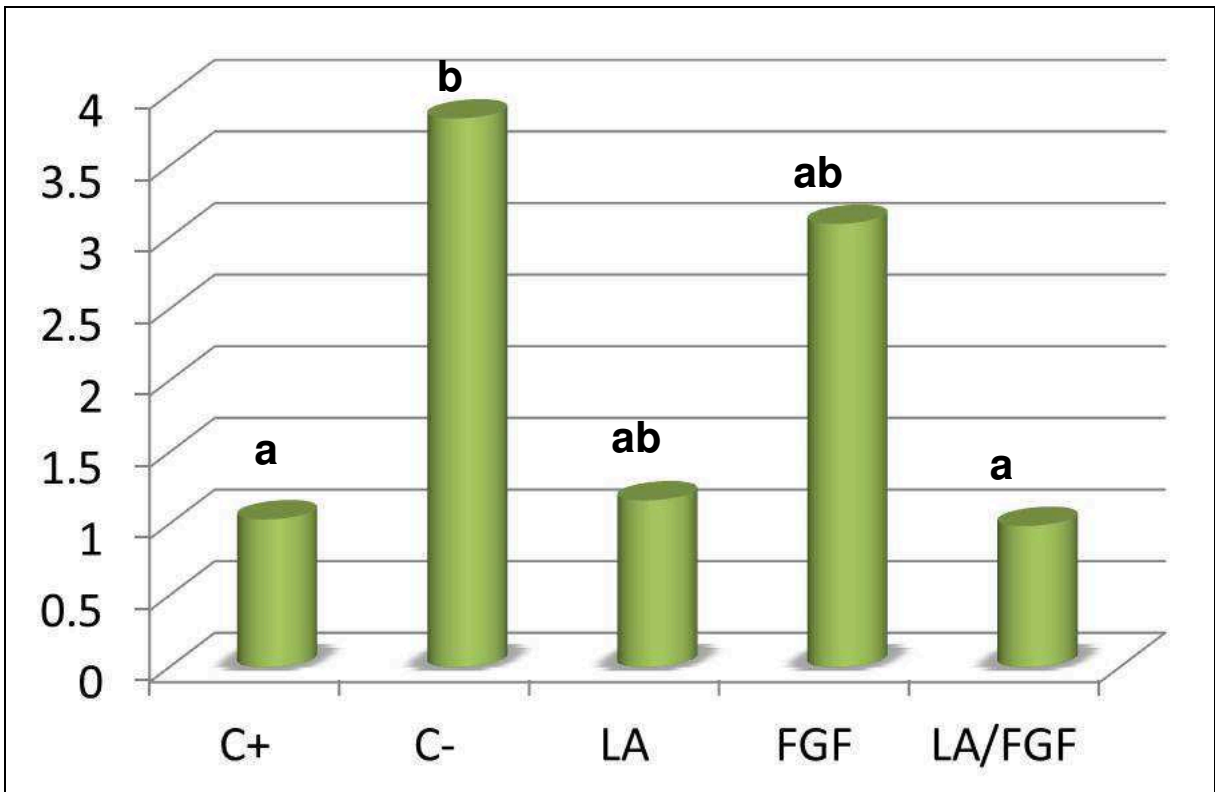


Figura 10 – Comparação das médias (%) das áreas de reabsorção entre os grupos e resultados da análise estatística pelo teste Kruskal-Wallis. *Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0.05$)

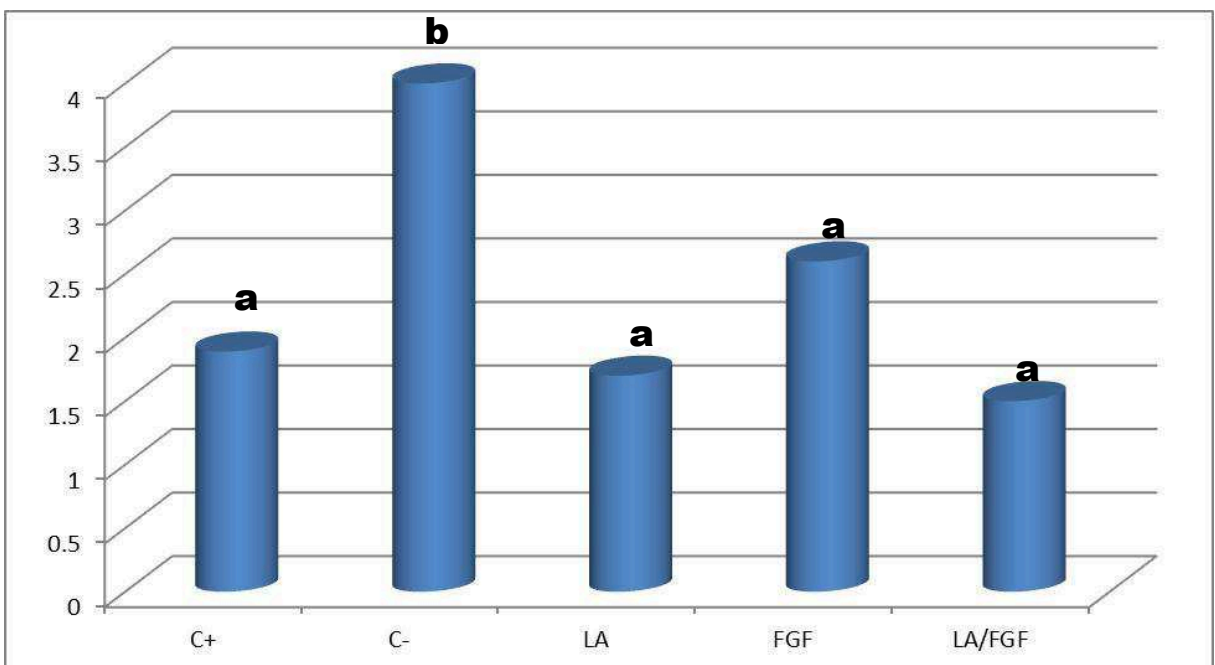


Figura 11 – Comparação das médias dos números das áreas de reabsorção entre os grupos experimentais e controles, e resultados da análise estatística pelo teste ANOVA. *Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0.05$)

A porcentagem de áreas reabsorvidas foi em ordem decrescente: C- > FGF > LA > C+ > LA+FGF.

O grupo experimental que apresentou a menor porcentagem de área de reabsorção foi o Grupo LA + FGF, que não diferiu estatisticamente do Grupo C+. Os grupos LA e FGF não diferiram estatisticamente entre si, e obtiveram menores áreas de reabsorção do que o grupo controle negativo C-.

Considerando a quantidade de números de áreas reabsorvidas, os resultados foram em ordem decrescente: C- > FGF > C+ > LA > LA+FGF. O grupo controle positivo (C+) e os grupos experimentais (LA, FGF, LA + FGF) apresentaram menores números de áreas de reabsorção do que o grupo controle negativo (C-) inclusive com diferença estatisticamente significativa.

Nas figuras 12, 13, 14, 15 e 16, foram selecionadas as imagens radiográficas representativas dos elementos dentais reimplantados (a) e o dente homólogo (b) de cada grupo avaliado.



Figura 12 – Imagem radiográfica representativa das áreas de reabsorção do elemento dental do grupo controle (C+) e seu homólogo

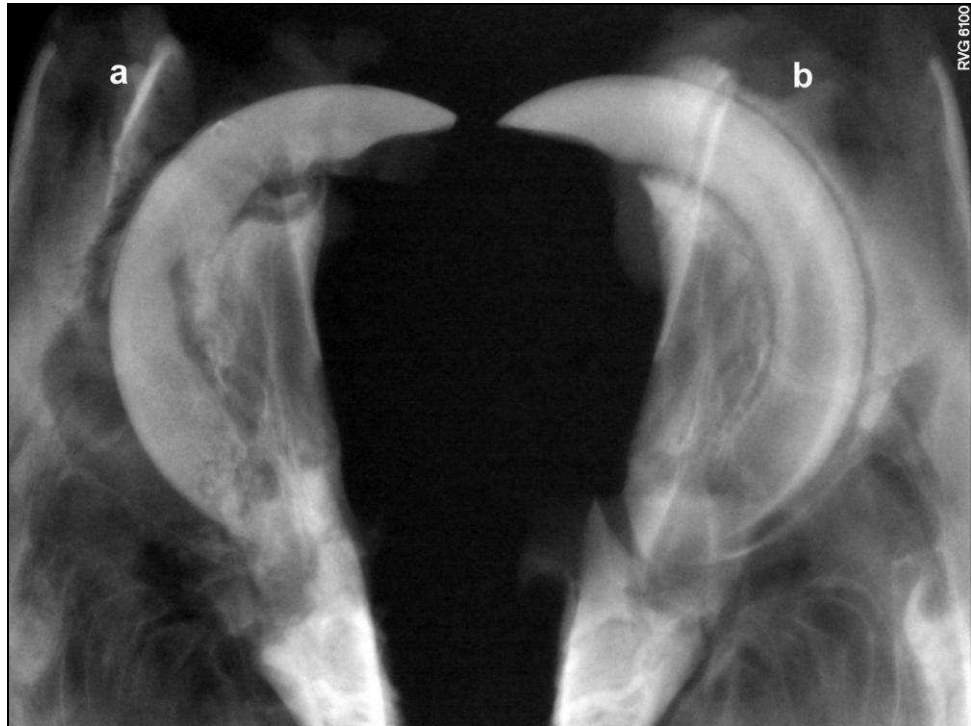


Figura 13 – Imagem radiográfica representativa das áreas de reabsorção do elemento dental do grupo controle (C-) e seu homólogo



Figura 14 – Imagem radiográfica representativa das áreas de reabsorção do elemento dental do grupo irradiado com laser de alta potência (LA) e seu homólogo

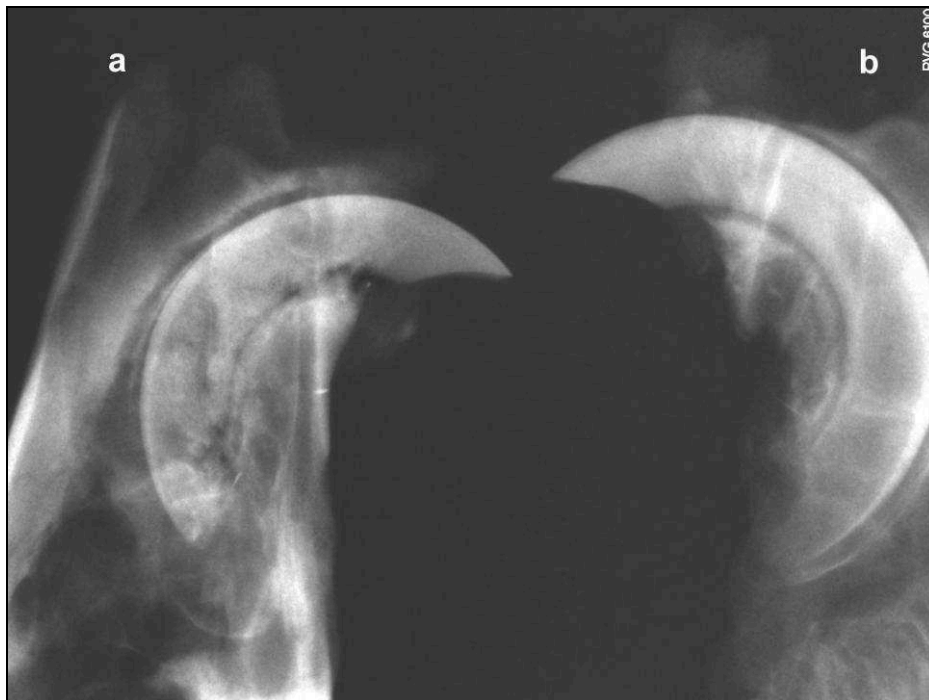


Figura 15 – Imagem radiográfica representativa das áreas de reabsorção do elemento dental tratado apenas com fator de crescimento de fibroblastos e seu homólogo (Grupo FGF)

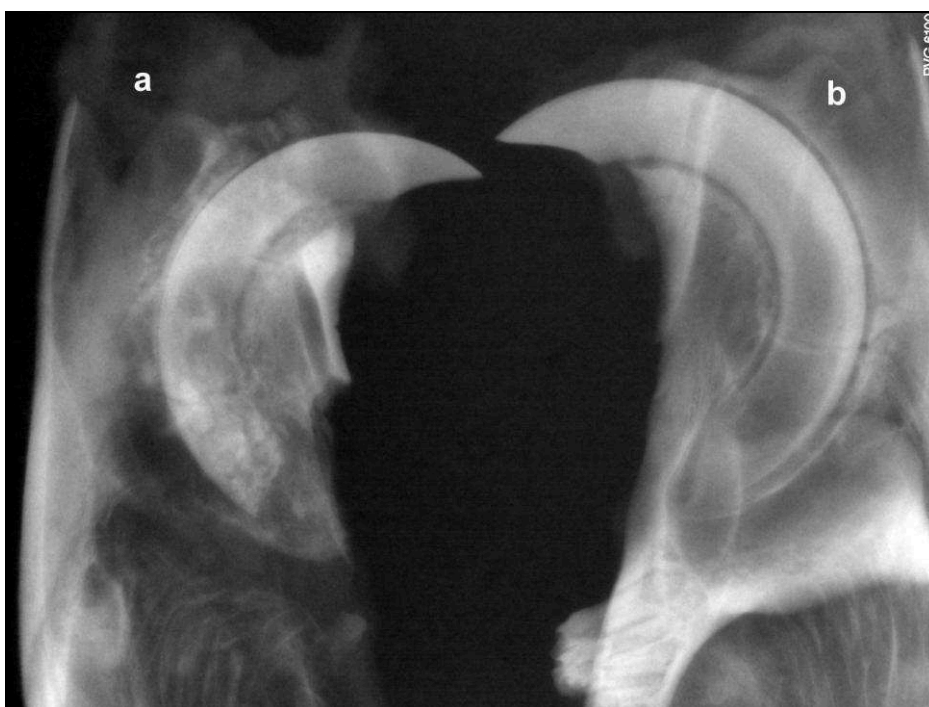


Figura 16 – Imagem radiográfica representativa das áreas de reabsorção do elemento dental tratado com laser de alta potência e fator de crescimento de fibroblastos e seu homólogo (Grupo LA + FGF)

5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA

5.2.1 ANÁLISE DESCRITIVA DOS EVENTOS HISTOLÓGICOS

Durante o processamento histológico, treze animais foram perdidos (group C+: três, C-:2, LA: 3, FGF:2, LA+FGF:3), o que resultou na redução do tamanho da amostra total para 37, e o número de espécimes para cada grupo (C+= 7, C-= 8, LA= 7, FGF= 8, LA+FGF= 7). Apesar dessas perdas, o número de espécimes por grupo ficou entre sete e dez, o que é consistente com o número de espécimes utilizados em outros estudos que investigaram reimplante dental em animais (Lam & Sae-lim, 2004; Saito et al., 2011).

Os resultados obtidos foram descritos, após a análise qualitativa por terços de cada corte histológico, onde as seguintes estruturas foram observadas: ligamento periodontal, superfície radicular, tecido conjuntivo adjacente e parede óssea alveolar.

Grupo C+ (controle positivo)

A superfície radicular, na maioria dos espécimes, apresentou ausência de reabsorção inflamatória, substitutiva e anquilose.

O tecido conjuntivo adjacente apresentou-se espesso e organizado, com ausência de células inflamatórias. O ligamento periodontal exibiu fibras reinsertadas, com disposição perpendicular à superfície radicular (Figura 17).

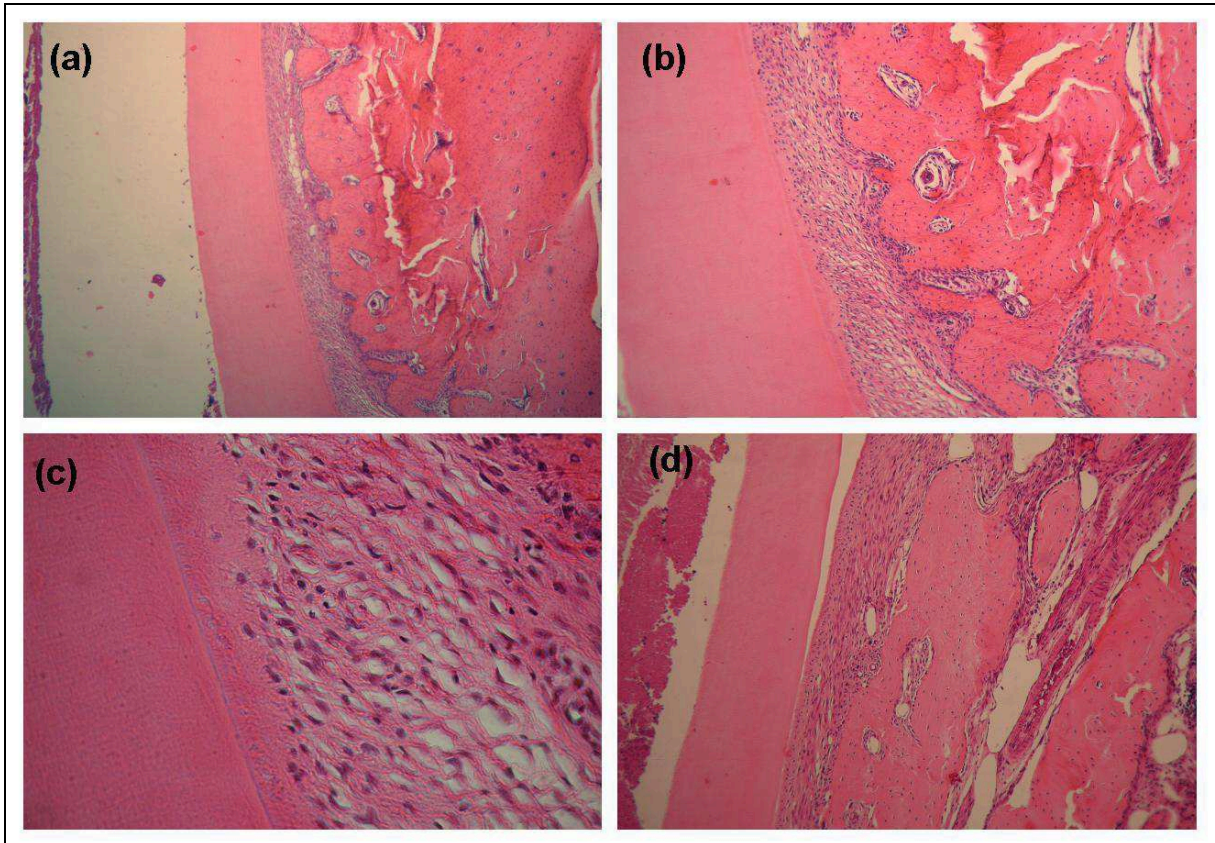


Figura 17 – Cortes representativos do grupo C+ (G1): (a) Ausência de reabsorção inflamatória, substitutiva e anquilose. Aumento 50X; (b) Aumento 100 X; (c) Reinserção perpendicular das fibras ao cimento, aumento 400X; (d) Tecido conjuntivo espesso e organizado. Aumento 50X

Grupo C- (controle negativo)

Em quase todos os espécimes, o cimento e a dentina encontraram-se reabsorvidos, com presença de células inflamatórias ou substituídos por tecido ósseo, e a superfície radicular apresentando, em muitos pontos, contato direto com o tecido ósseo adjacente (anquilose).

O espaço do ligamento periodontal encontrou-se em grande parte da raiz preenchido por tecido ósseo.

O tecido conjuntivo apresentou-se desorganizado e afastado, e as fibras do ligamento periodontal, quando presentes, apresentavam-se finas e dispersas, sem reinserção à superfície radicular (Figura 18).

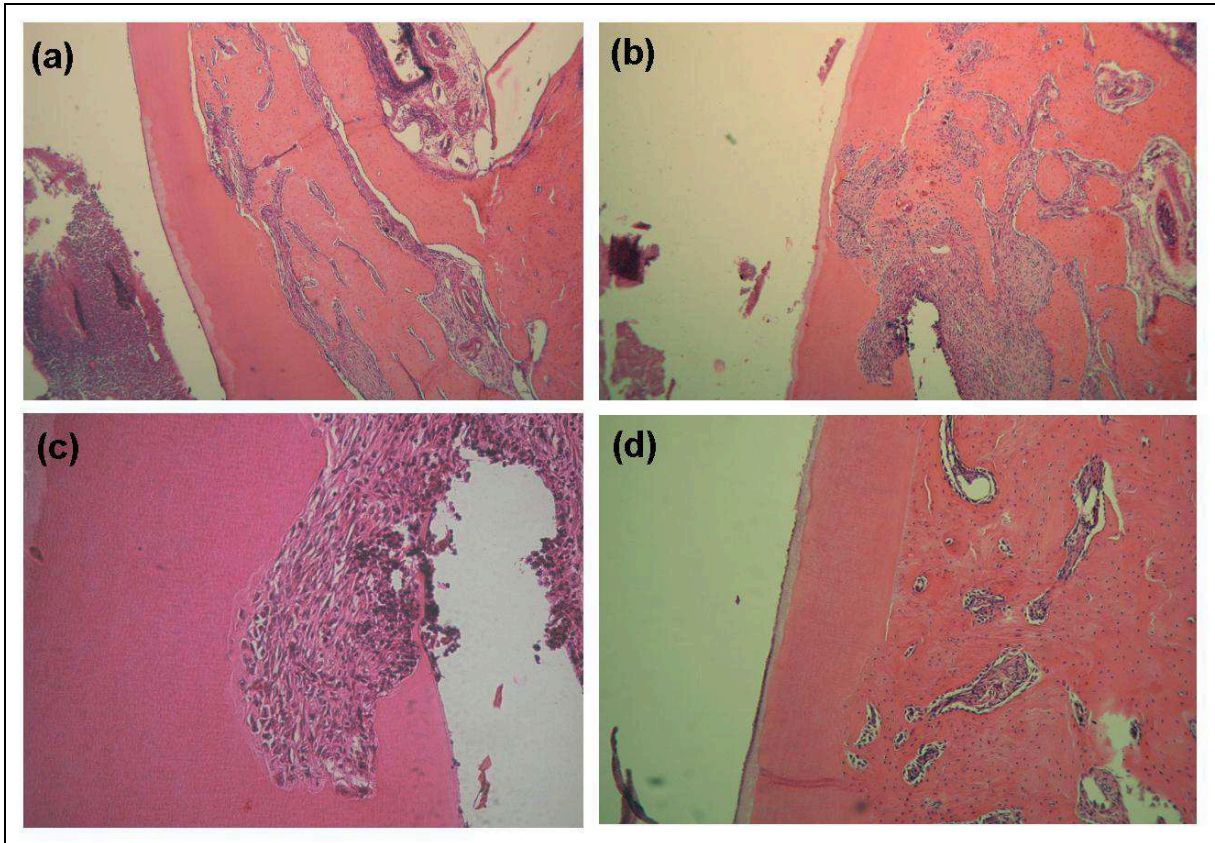


Figura 18 – Cortes representativos do grupo C- (G2): (a) Extensas áreas de reabsorção substitutiva e superfície radicular apresentando em vários pontos, contato direto com o tecido ósseo adjacente (anquilose). Aumento 50X; (b) Extensas áreas de reabsorção inflamatória (50X); (c) Reabsorção inflamatória (200X); (d) Extensas áreas de reabsorção substitutiva e anquilose e ausência de fibras do ligamento periodontal (Objetiva 100X)

Grupo LA (Laser de alta potência na superfície radicular)

Em apenas um espécime foram observadas pequenas áreas reabsorvidas com substituição por tecido ósseo e a superfície radicular apresentando contato direto com o osso adjacente (anquilose). O cimento e a dentina encontraram-se reabsorvidos, com presença de células inflamatórias, em dois espécimes. Os demais, não apresentaram reabsorção da superfície radicular.

O tecido conjuntivo adjacente apresentou-se espesso e organizado, com ausência de células inflamatórias em quase todos os espécimes. O ligamento periodontal exibiu fibras esparsas e afastadas da superfície radicular (Figura 19).

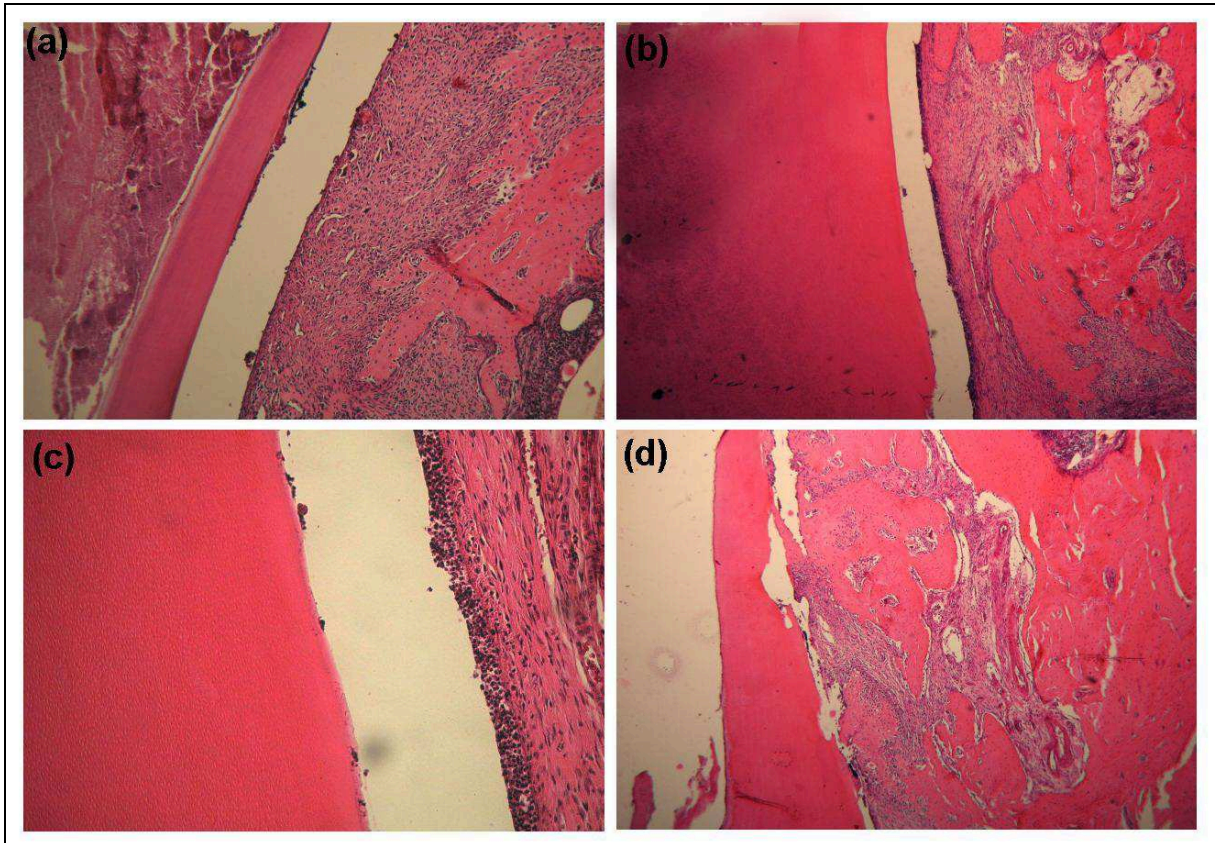


Figura 19 – Cortes representativos do grupo LA (G3): (a) e (b) Ausência de reabsorção inflamatória, substitutiva e anquilose (Aumento 50X); (c) Tecido conjuntivo espesso e organizado, porém, com fibras do ligamento periodontal afastadas da superfície radicular (200X); (d) Áreas de reabsorção da superfície radicular com presença de células inflamatórias (100X)

Grupo FGF (Fator de crescimento de fibroblastos)

Em algumas áreas, o cimento e a dentina encontraram-se reabsorvidos, com presença de células inflamatórias ou substituídos por tecido ósseo e a superfície radicular apresentando contato direto com o tecido ósseo adjacente (anquilose).

Muitos espécimes apresentaram o tecido conjuntivo delgado e desorganizado com ausência de fibras do ligamento periodontal. Quando estas fibras eram presentes, não estavam reinsertadas à superfície radicular (Figura 20).

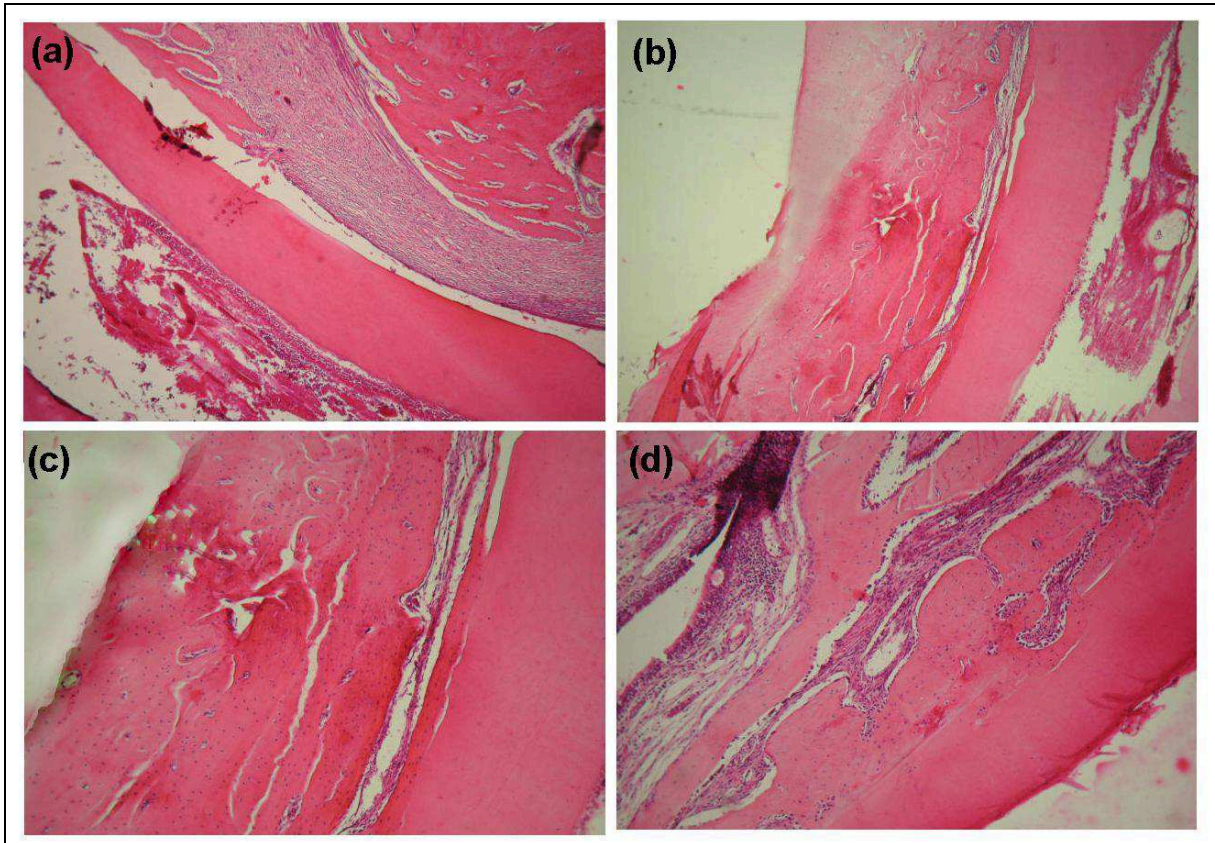


Figura 20 – Cortes representativos do grupo FGF (G4): (a) Ausência de reabsorção inflamatória, substitutiva e anquilose. Tecido conjuntivo organizado e espesso, mas, sem reinserção das fibras do ligamento periodontal (Aumento 50X); (b) Áreas de reabsorção substitutiva (50X); (c) e (d) Extensas áreas de reabsorção substitutiva, anquilose e ausência de fibras do ligamento periodontal (100X)

Grupo LA + FGF

Em algumas áreas, o cimento e a dentina encontraram-se reabsorvidos, com presença de células inflamatórias ou substituídos por tecido ósseo e a superfície radicular apresentando em alguns pontos, contato direto com o tecido ósseo adjacente (anquilose).

Na maioria dos espécimes, o tecido conjuntivo adjacente apresentou-se espesso e organizado. Notou-se a presença de fibras do ligamento periodontal em todos os espécimes, e em duas, estas apresentaram-se reinseridas, com disposição perpendicular à superfície radicular (Figura 21).

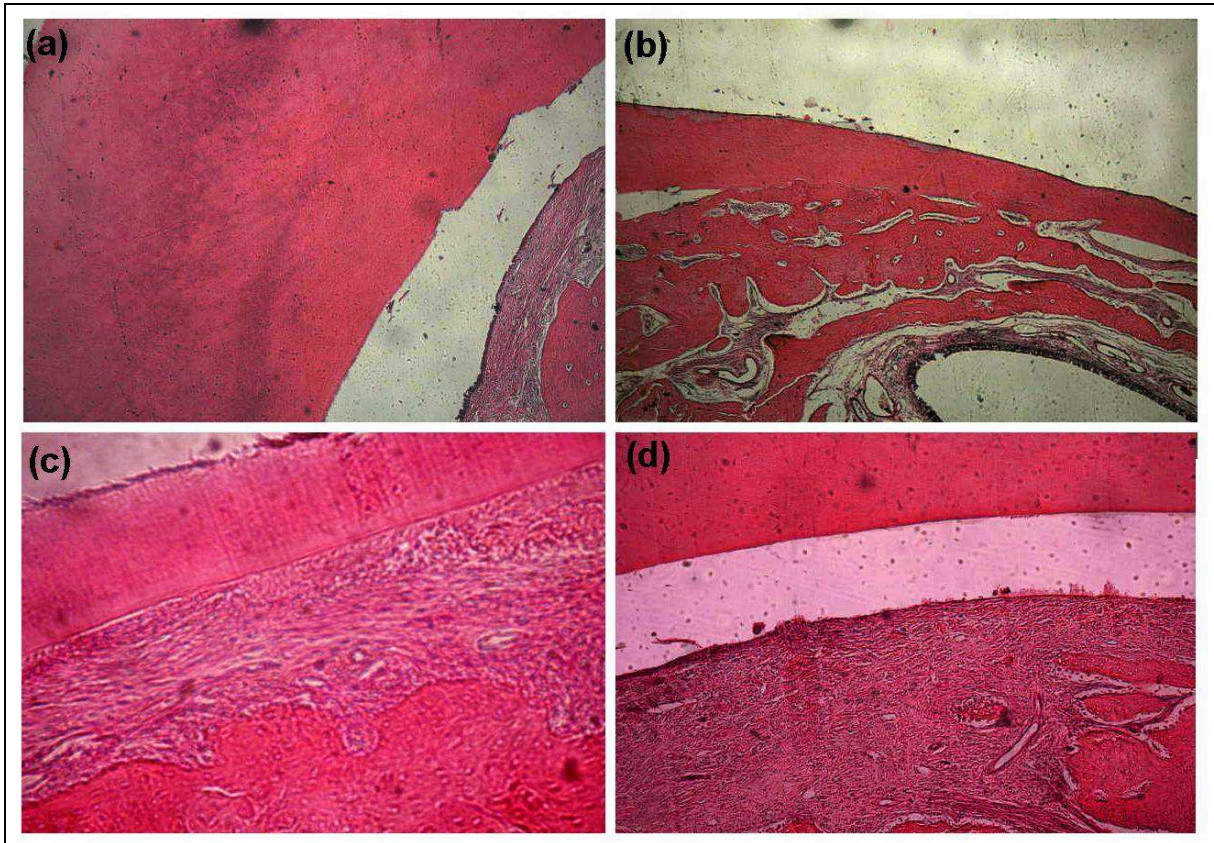


Figura 21 – Cortes representativos do grupo LA/FGF(G5): (a) ausência de reabsorção inflamatória, substitutiva e anquilose (Aumento 50X); (b) presença de anquilose (50X); (c) presença de fibras do ligamento periodontal reinseridas ao cimento (200X); (d) tecido conjuntivo organizado e espesso (100X)

5.2.2 ANÁLISE DOS EVENTOS HISTOLÓGICOS POR MEIO DE ESCORES

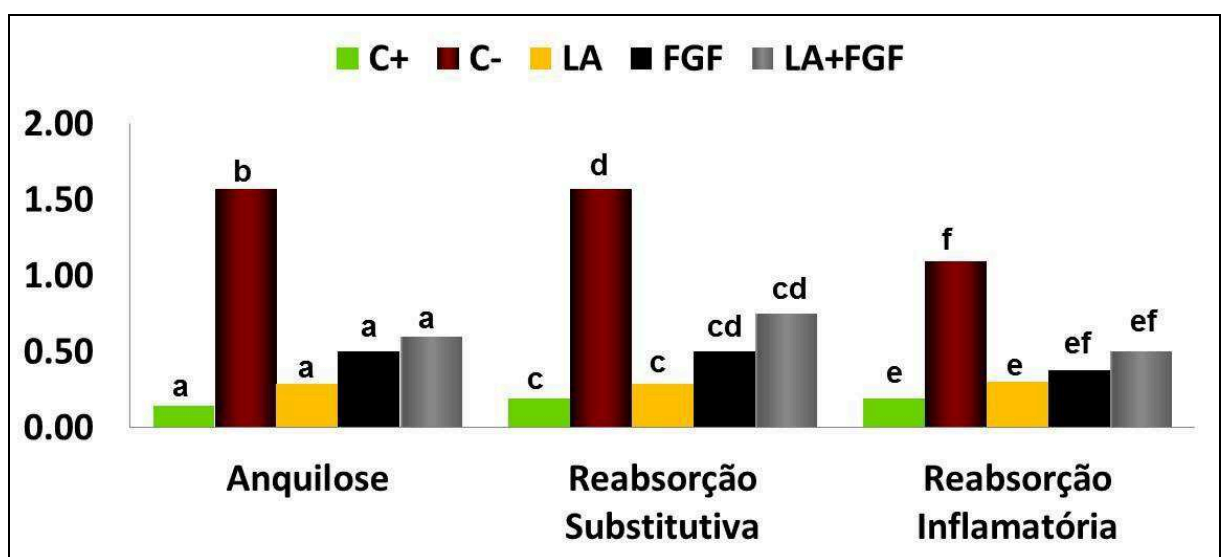
Nesta análise, foram atribuídos escores aos eventos de reabsorção inflamatória, por substituição e anquilose. Na tabela 2, estes escores foram descritos de acordo com sua frequência.

A figura 22 apresenta um gráfico ilustrando a comparação desses eventos histológicos entre os grupos.

Os dados originais desse teste estatístico estão expressos nos apêndices C, D e E.

Tabela 2 - Frequência dos escores atribuídos aos eventos histológicos de acordo com cada grupo experimental e controle

Eventos Histológicos	Escores	C+ (n=7)	C- (n=8)	LA (n=7)	FGF (n=8)	LA+FGF (n=7)
Reabsorção por Substituição	0- Ausente	6	4	6	5	3
	1- Até 1/3	1	0	0	2	2
	2- De 1/3 a 2/3	0	0	1	0	2
	3 -Mais de 2/3	0	4	0	1	0
Reabsorção Inflamatória	0- Ausente	4	3	6	6	4
	1- Até 1/3	3	0	0	2	3
	2- De 1/3 a 2/3	0	4	1	0	0
	3 -Mais de 2/3	0	1	0	0	0
Anquilose	0- Ausente	6	4	6	5	3
	1- Até 1/3	0	0	0	2	3
	2- De 1/3 a 2/3	1	0	1	0	1
	3 -Mais de 2/3	0	4	0	1	0

Figura 22 – Representação gráfica das comparações das médias dos escores e resultados da análise estatística pelo Teste Kruskal- Wallis. *Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0.05$)

Ao avaliarmos a presença de reabsorção substitutiva, o grupo LA apresentou maior quantidade de escore 0 (ausência deste processo) e em apenas um espécime deste grupo foi observada pequena área de reabsorção por substituição, o que não apresentou nem 1/3 da superfície radicular. O grupo LA apresentou menor reabsorção inflamatória do que o controle negativo, e apresentou semelhança estatística com o controle positivo.

Os grupos experimentais que receberam irradiação com laser de alta potência na superfície radicular (LA e LA+FGF) apresentaram menor quantidade de anquilose, e se assemelharam ao controle positivo.

Para a análise da reparação periodontal, as características do tecido conjuntivo, bem como a presença de reinserção das fibras do ligamento periodontal, foram classificadas por escores e tratadas estatisticamente. Abaixo se encontram as tabelas com a frequência dos escores relativos às características do tecido conjuntivo (tabela 3) e às características das fibras e reinserção periodontal (tabela 4). O gráfico com a comparação das médias dos escores dos eventos referidos à reparação periodontal entre os grupos está representado na figura 23.

Os dados originais desta análise estatística estão representados no apêndice F e G.

Tabela 3 - Frequência dos escores atribuídos às características do tecido conjuntivo de acordo com cada grupo experimental e controle

Escore	C+(n=7)	C- (n=8)	LA (n=7)	FGF (n=8)	LA+FGF (n=7)
0- Ausente	0	4	0	3	0
1-Delgado/Desorganizado	1	4	1	4	3
2- Espesso/Organizado	6	0	6	1	4

Tabela 4- Frequência dos escores atribuídos à presença de fibras do ligamento periodontal e sua reinserção ao cimento

Escores	C+ (n=7)	C- (n=8)	LA (n=7)	FGF (n=8)	LA+FGF (n=7)
0- Ausente	0	4	0	3	0
1- Fibras não inseridas ao cimento	1	4	7	5	5
2- Fibras reinseridas ao cimento	6	0	0	0	2

Quanto à análise da reparação periodontal, a presença de um tecido conjuntivo espesso e organizado foi observado em grande parte nos grupos C+, LA e LA + FGF.

O único grupo experimental em que foi observada a reinserção das fibras periodontais ao cimento foi o LA+FGF, embora tenha ocorrido apenas 2 espécimes.

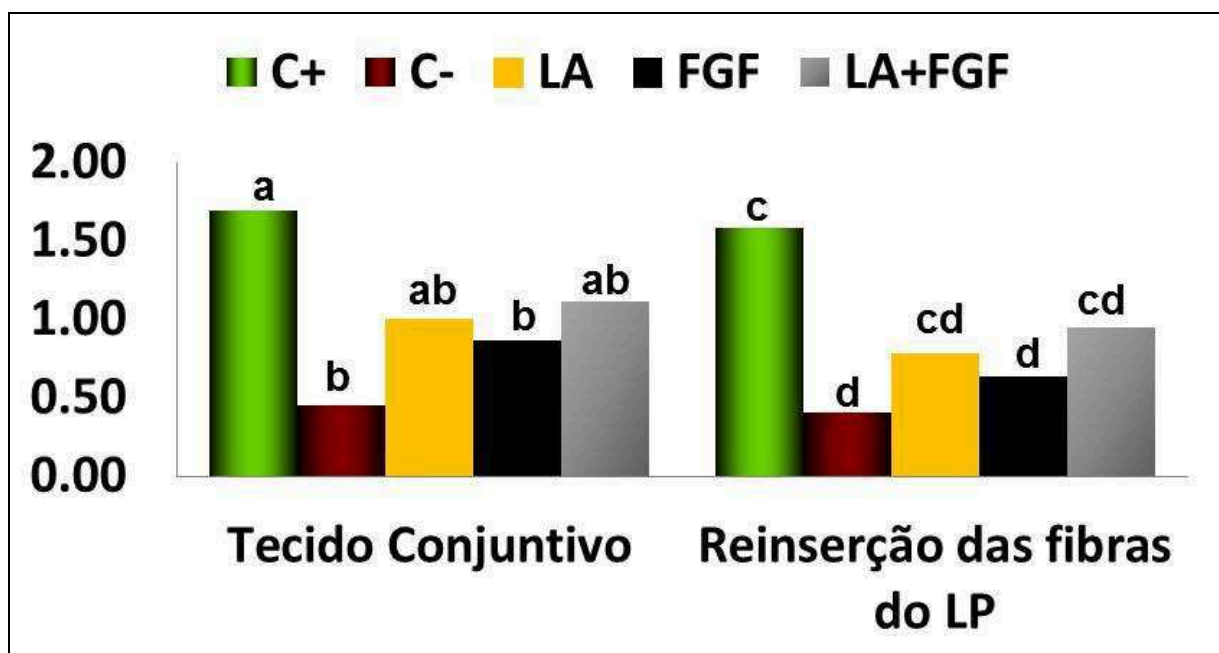


Figura 23 - Comparação do valor dos escores de acordo com as características do tecido conjuntivo e reinserção das fibras do ligamento periodontal entre os grupos experimentais e controles e resultados da análise estatística pelo Teste Kruskal-Wallis. *Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0.05$)

5.2.3 ANÁLISE QUANTITATIVA DAS FIBRAS COLÁGENAS

Os valores das médias e desvio padrão obtidos pela quantificação da porcentagem de fibras colágenas do tipo I coradas pelo Picrosirius red nos diferentes grupos experimentais e controles, estão expressos na tabela 5.

Os resultados desta análise demonstraram que o grupo experimental LA + FGF foi o que apresentou a maior quantidade de fibras colágenas do tipo I, e não diferiram estatisticamente do grupo controle positivo (C+).

Os grupos LA e FGF apresentaram quantidade bem menor de fibras colágenas tipo I, não diferindo estatisticamente do grupo controle negativo (C-).

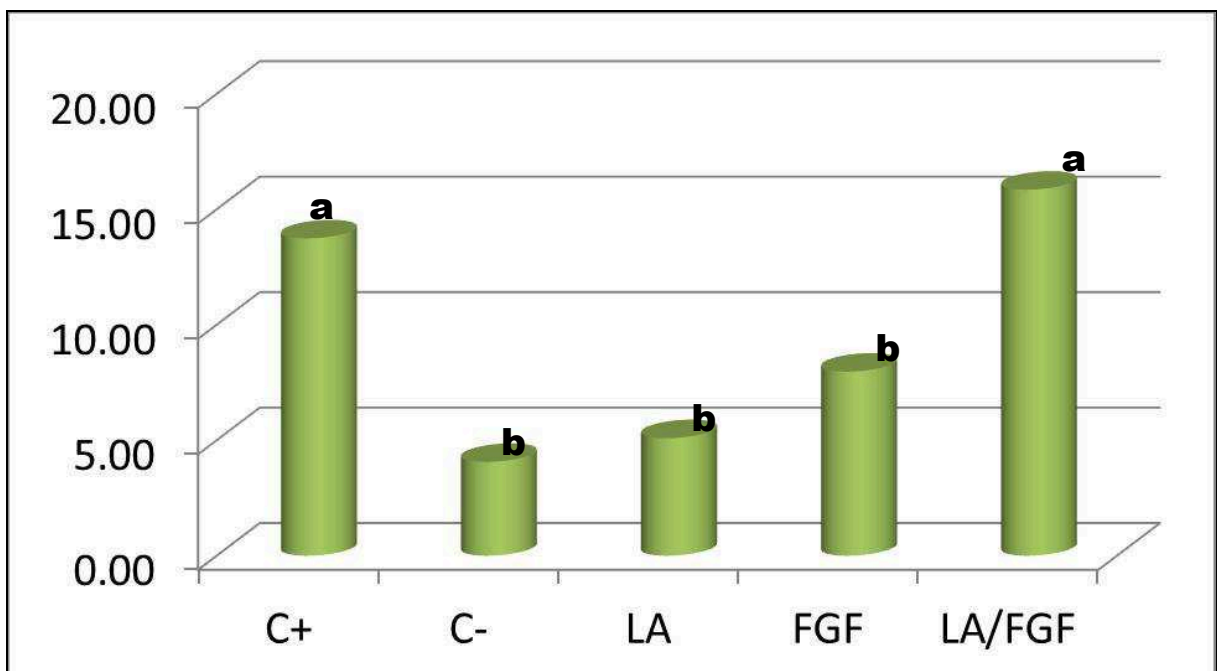
A comparação das médias entre os grupos da quantidade de fibras colágenas tipo I coradas pelo método Picrosírius Red está representada pela figura 24.

A figura 25 ilustra um corte representativo do grupo controle positivo, demonstrando a coloração das fibras colágenas do tipo I pelo método Picrosírius red.

Os dados originais e a análise estatística podem ser visualizados no apêndice H.

Tabela 5- Quantificação das fibras colágenas. Médias e desvio padrão nos diferentes grupos experimentais e controles

Dente	C+	C-	LA	FGF	LA+FGF
1	26.22	5.94	8.09	7.2	16.87
2	14.26	3.84	2.13	15.41	13.43
3	11.18	4.2	5.16	8.94	9.37
4	7.28	6.52	8.26	13.41	37.69
5	11.52	1.64	2.84	7.67	7.5
6	15.35	0.78	4.99	0	8.26
7	11.25	4.51	2.5	0	13.42
MÉDIA	13.87	4.26	4.85	7.57	15.22
DP	6.03	2.25	2.56	5.95	10.46

Figura 24 - Comparação das médias de fibras colágenas coradas pelo método de coloração Picrosírius Red entre os grupos experimentais e controles e resultados da análise estatística pelo teste Kruskal-Wallis. *Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0.05$)

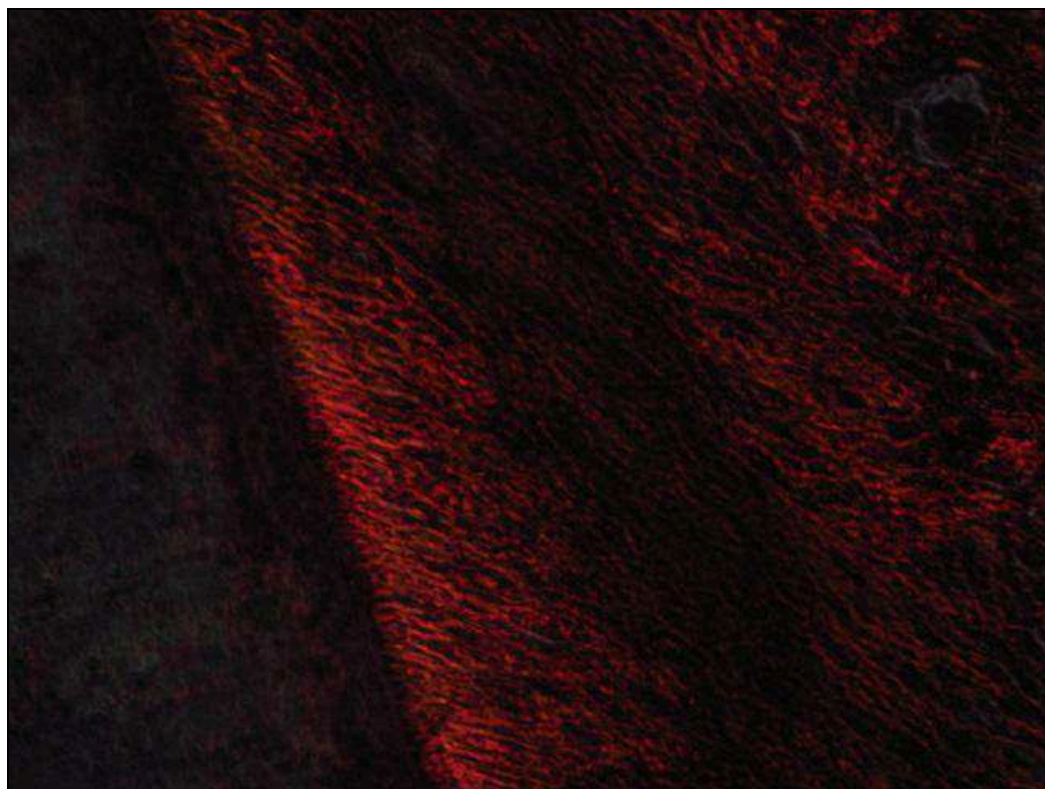


Figura 25 – Corte representativo do grupo C+ método Picrosírius Red: Fibras colágenas tipo I coradas em vermelho (Aumento 400X).

6 DISCUSSÃO

6.1 DA IMPORTÂNCIA DO TEMA

O tratamento dos dentes avulsionados ainda se constitui um desafio, devido à grande ocorrência de reimplantes tardios e consequente reabsorção radicular externa, que culmina muitas vezes com a perda dental. A maioria das avulsões ocorre em crianças e adolescentes e, portanto, antes da conclusão do crescimento facial (Trope, 2011; Andersson et al., 2012). A presença do dente permanente no alvéolo é um fator crítico para a manutenção do tecido de sustentação e do osso adjacente, daí a importância de um correto tratamento para a sua preservação pelo menos até que o crescimento facial se complete para receber uma reabilitação definitiva.

Diversos protocolos clínicos têm sido sugeridos no tratamento da avulsão dentária, mas ainda restam dúvidas quanto à melhor opção do tratamento da superfície radicular dos dentes que ficaram expostos ao meio por longos períodos. A aplicação de várias substâncias químicas foi proposta para este fim: Fluoreto de Sódio 2%, Vitamina C (Panzarini, 2005), Acetazolamida (Mori & Garcia, 2002), Dexametasona (Keum et al., 2003), Emdogain (Schojtt & Andreasen, 2005; Barrett et al., 2005; Poi et al., 2007), Alendronato de Sódio (Lustosa-Pereira et al., 2006), Nitrato de Gálio (Mori et al., 2007), Própolis (Gulinelli et al., 2008). Entretanto, esses tratamentos não inibiram o aparecimento das reabsorções radiculares externas.

O laser de diodo possui o menor custo dentre os lasers de alta potência, além de ser prático e portátil. Estudos têm demonstrado que estes apresentam atividade

antimicrobiana (Moritz et al., 1997; Kreisler et al., 2003; Gutknecht et al., 2004; De Souza et al., 2008), promovem alterações da estrutura cementária que podem facilitar a adesão celular, tornando-a com maior biocompatibilidade e mais resistente contra a ação de bactérias e toxinas (Haypek et al., 2006; Hamaoka et al., 2009; Raldi et al., 2010), reduzindo significativamente a incidência de reabsorções radiculares externas em estudo com dentes de ratos reimplantados tardiamente.

O tratamento dos dentes avulsionados deve envolver protocolos que visem tanto a redução das subseqüentes reabsorções como a promoção da regeneração do ligamento periodontal (Wang et al., 2010). As pesquisas com fatores de crescimento de fibroblastos comprovam a sua capacidade de promover a regeneração periodontal, porém, ainda são poucos os estudos que avaliam a sua efetividade na regeneração do tecido periodontal danificado após reimplantes tardios.

Seguindo esta linha de raciocínio, a associação do tratamento da superfície radicular pelo laser de diodo de alta potência com fatores bioestimuladores da regeneração periodontal, pode gerar resultados satisfatórios no que diz respeito à redução da incidência de reabsorções radiculares e estimulação do reparo periodontal com o fito de buscar alternativas para o tratamento dos reimplantes tardios.

6.2 DA METODOLOGIA

O modelo experimental escolhido neste estudo foi o rato, pelo baixo custo, fácil obtenção e acesso. Além disto, sua utilização em pesquisas no reparo das

estruturas periodontais, especialmente em reimplantes dentários, encontra-se já sedimentada na literatura (Panzarini et al., 2005; Mori et al., 2006; Lustosa-Pereira et al., 2006; Gulinelli et al., 2008; Saito et al., 2011). Alguns pesquisadores demonstram a preocupação de se realizar estudos com dentes de rato devido ao seu crescimento contínuo proveniente da presença da papila dentária, entretanto, para minimizar esta diferença, removemos a papila dentária evitando a continuidade da formação radicular, o que impediria a fidedignidade da pesquisa.

A necrose pulpar ocorre em quase 100% de dentes reimplantados que apresentam rizogênese completa (Trope, 2011), o que justifica a realização do tratamento endodôntico em nosso estudo. O momento ideal para a realização da intervenção endodôntica é um dos pontos discutidos na literatura. Alguns autores preconizam o tratamento antes do reimplante pelo fato de que a reabsorção inflamatória é causada pelo material necrótico que permanece no interior do canal radicular (Assunção et al., 2011; Andersson et al., 2012). Dessa forma, optou-se, nesse modelo experimental, pela realização deste procedimento previamente, para que todas as variáveis relacionadas com complicações oriundas da polpa pudessem ser diminuídas ou anuladas, já que o objetivo do estudo relacionava-se ao reparo do ligamento periodontal.

A medicação intracanal utilizada no presente estudo foi o hidróxido de cálcio, por ser a medicação de eleição para a prevenção e o tratamento das reabsorções, em razão de suas propriedades antimicrobianas, antiinflamatórias, indutoras de tecido mineralizado, atuação em células clásticas e biocompatibilidade já consagradas na literatura (Tronstad et al., 1981; Trope et al., 1995; McIntyre et al., 2009). A associação do hidróxido de cálcio com um veículo hidrossolúvel forma uma pasta que favorece a penetração dos íons nos túbulos dentinários, potencializando a

sua ação (Tronstad et al., 1981; Trope et al., 1995). Neste estudo foi utilizada a pasta de hidróxido de cálcio Calen®, por ser pré-fabricada, apresentando assim uma proporção pó/líquido constante, sendo de fácil aplicação e tendo o polietilenoglicol 400 como veículo viscoso e hidrossolúvel.

Além dos procedimentos locais, com o intuito de controlar interferências que pudessem contribuir para a contaminação nos casos de reimplante dentário, foi instituída a antibioticoterapia sistêmica utilizando um pentabiótico que reúne em sua composição cinco antibióticos com ação predominantemente bactericida em todos eles. Alguns autores também afirmam que além de diminuir o risco de infecção, o antibiótico atua no processo inflamatório que ocasiona a reabsorção radicular (Assunção et al., 2011; Trope, 2011).

Os processos de reabsorção radicular e regeneração periodontal só podem ser avaliados após um período de tempo que permita a ocorrência desses acontecimentos. A opção pelo período de sessenta dias para a eutanásia dos ratos foi feita seguindo estudos prévios com o mesmo modelo animal, com a justificativa de que, após oito semanas, o cimento se apresenta mineralizado e o ligamento periodontal maduro, com fibras bem organizadas (Poi et al., 2007; Saito et al 2011; Kim et al 2012). Panzarini et al. 2013, entretanto, em um estudo mais recente confirmou por meio de imuno-histoquímica, que nos casos de reimplante tardio, uma maior atividade de formação óssea ocorre nos primeiros períodos do processo de reparo, enquanto que a reabsorção e remodelação óssea ocorrem nos períodos mais avançados.

Quando o reimplante dental é realizado tardiamente, é necessário que se faça a remoção do ligamento periodontal necrosado. Este procedimento pode ser realizado por meio de remoção mecânica com brocas ou curetas, ou por meio de

substâncias químicas (Panzarini et al., 2005). A remoção mecânica causa danos ao cimento, e expõe a dentina, o que dificulta consideravelmente o reparo. Deve-se deixar o máximo possível de cimento para favorecer a desaceleração da reabsorção substitutiva (Trope, 2011). Desta forma, neste estudo optou-se por utilizar o hipoclorito de sódio a 1% para tal fim, por suas propriedades de dissolução de tecido orgânico, desnaturação de proteínas e por não causar danos ao cimento (Lustosa-Pereira et al., 2006). Seshima et al. (2010), contudo, realizaram a raspagem das fibras do ligamento periodontal com curetas periodontais e ainda obtiveram o reparo periodontal com a aplicação de FGF-2. Esses autores salientam que é melhor remover todo o ligamento do que deixar algumas fibras que possam vir a necrosar posteriormente.

O dente escolhido neste experimento foi o incisivo central superior direito, uma vez que os dentes anteriores são os mais acometidos pelos traumas devido à sua posição frontal na maxila e projeção vestibular (Andreasen & Andreasen, 2001). Como o incisivo do rato apresenta uma forma anatômica curva, a sua própria inserção no alvéolo despreza a necessidade de contenção. Ademais, a esplintagem no incisivo adjacente ocasionaria a compressão do periodonto contra a parede mesial do alvéolo junto ao terço cervical e um espaço na distal, o que facilitaria a perda do coágulo sanguíneo e contaminação local (Moreira Neto, 2002).

Nesta pesquisa, utilizou-se o laser diodo de alta potência para a irradiação da superfície radicular em dois grupos experimentais (Grupo 3=LA e Grupo 5=LA + FGF). A escolha dos parâmetros utilizados se baseou em um estudo prévio, onde utilizamos os mesmos protocolos de irradiação e obtivemos uma redução significativa das reabsorções radiculares externas: comprimento de onda de 810nm, no modo contínuo, fibra óptica de quartzo de 600µm, feixe de luz guia de diodo

vermelho de 650nm, 1,5W de potência input (monitor), movimentos de varredura, com a fibra óptica posicionada na angulação de 45⁰ em contato com a superfície radicular, por um tempo de trinta segundos, sendo dez segundos para as faces proximais e cinco segundos para as faces vestibular e lingual (Carvalho et al 2012). Este comprimento de onda é bem absorvido pelos tecidos pigmentados, sem causar danos à superfície radicular (Romanos & Nentwig,1999).

Para avaliação histológica, optou-se pelo corte histológico longitudinal no sentido vestibulo-lingual, por fornecer uma visão melhor de toda a extensão do ligamento periodontal que está predominantemente presente na face palatina da raiz. Embora tenha sido notada maior dificuldade técnica para a sua realização do que os cortes transversais, além da ausência das superfícies mesial e distal, foi relatado que os resultados satisfatórios observados nas faces vestibular e lingual, reproduzem ainda melhores resultados nas faces mesiais e distais, já que, o terço médio do ligamento periodontal nas regiões vestibular e lingual, apresenta menor fluxo vascular e maior tendência a reabsorções devido à maior convexidade dessas superfícies (Assunção et al 2011).

A maioria dos trabalhos utilizou métodos histológicos e histomorfométricos para avaliar o processo de reparo no reimplante dentário (Sae-Lim et al., 2004; Lam & Sae-Lim, 2004; Poi et al., 2007; Seshima et al., 2010; Saito et al., 2011). Neste trabalho acrescentamos ainda a análise quantitativa das fibras colágenas, e para tal, foi utilizada a coloração pelo método de picrosirius red, o qual estimula grande quantidade de moléculas do Sirius Red, que se colocam paralelamente às moléculas do colágeno. Isto provoca aumento da birrefringência das fibras que conservam colágeno ao serem observadas à luz polarizada. O método da coloração com picrosirius, associado à microscopia de polarização, constitui um método

histoquímico específico para a percepção de estruturas compostas de moléculas de colágeno orientadas (De Macedo, 2001). A leitura das lâminas foi realizada com microscópio óptico binocular (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Zena- Alemanha) associado a um filtro de polarização e programa Image- Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA), para identificar e quantificar as fibras colágenas do tipo I coradas pelo picrossírius na área selecionada.

Os elementos mais importantes do ligamento periodontal são as fibras principais, de natureza colágena, dispostas em feixes, que seguem curso ondulado quando vistas em cortes longitudinais. As porções terminais das fibras principais que se inserem no cimento e no osso são chamadas de fibras de Sharpey, compostas principalmente por colágeno tipo I. O colágeno tipo III parece recobrir o colágeno tipo I das fibras de Sharpey. Vale salientar que a maior parte da porção orgânica do cimento é composta por colágeno tipo I (90%) e tipo III (em torno de 5%) (Newman et al, 2007). Desta forma, justificamos mais uma vez a utilização do método picrossírius.

6.3 DOS RESULTADOS OBTIDOS

Os resultados encontrados no grupo controle positivo (C+) foram os melhores, tanto na análise radiográfica quanto na análise histológica. Neste grupo, os dentes foram reimplantados imediatamente, portanto, as fibras e células periodontais ainda se encontravam viáveis e ocorreu uma regeneração periodontal completa, com reinserção perpendicular das fibras ao cimento. O dano às estruturas do ligamento periodontal foi menor, observando-se uma menor resposta inflamatória. Isto reforça

mais uma vez a importância do tempo no prognóstico dos reimplantes (Saito et al., 2011; Andersson et al., 2012).

No grupo controle negativo (C-), onde os dentes foram reimplantados tardiamente e sem nenhum tratamento radicular ou do alvéolo, houve maior ocorrência de anquilose e reabsorção inflamatória e substitutiva. Este fato é justificado pela presença das células necrosadas do ligamento periodontal associada à exposição da camada de cimento que atraíram as células clásticas à região, iniciando o processo reabsortivo (Barret & Kenny, 1997; Trope, 2011). O reparo periodontal não ocorreu e o tecido conjuntivo mostrou-se bem desorganizado, e na maioria das vezes, com ausência de fibras do ligamento periodontal.

A irradiação com laser de diodo de alta potência mostrou, resultados positivos na redução dos processos reabsortivos da superfície radicular, semelhantes aos relatados por Carvalho et al. (2012). Os grupos LA e LA + FGF apresentaram pequena incidência de reabsorções substitutivas e inflamatórias e anquilose quando comparados ao grupo sem tratamento da superfície radicular (C-). Isto pode ser explicado pela alteração na estrutura cementária promovida pelo laser, pois a fusão e ressolidificação da superfície irradiada são capazes de produzir uma superfície mais resistente à ação das células clásticas. Essas modificações estruturais já foram comprovadas através da microscopia eletrônica de varredura em outras pesquisas (Haypek et al., 2006; Raldi et al., 2010).

A utilização do laser de diodo de alta potência tem aumentado o sucesso de tratamentos endodônticos e periodontais devido ao seu potencial antimicrobiano (Moritz et al. 1997; Gutknecht et al.2004). Pode-se também inferir que pela ação física do laser de alta potência, além do próprio contato da fibra óptica na angulação de 45° com a superfície radicular associado ao movimento de varredura tenha sido

promovida a remoção das fibras inviáveis do ligamento periodontal que por ventura ainda estivessem ali aderidas, confirmando a importância da remoção total das fibras necrosadas para o reparo (Seshima et al., 2010).

Somente a utilização do laser de diodo na superfície radicular, entretanto, não interferiu significativamente na regeneração periodontal. A análise histológica qualitativa do grupo LA demonstrou que o tecido conjuntivo apresentou-se espesso e organizado na maioria dos espécimes, porém, não houve reinserção das fibras do ligamento periodontal em nenhum espécime. Esta falta de adesão celular às superfícies irradiadas pelo laser de diodo também foi citada em alguns estudos (Kreisler et al. 2001; Theodoro et al., 2006; Carvalho et al., 2012).

A formação tecidual durante o reparo requer o movimento orquestrado de células em direções particulares que estimulem a migração, proliferação e adesão das células para os locais específicos (Ramseier et al 2012). Nesse estudo, propusemo-nos a avaliar se a aplicação do FGF-2 à superfície radicular tratada antes do reimplante tardio estimularia esses eventos para ocorrência da regeneração periodontal.

Apenas a utilização do FGF-2, sem um tratamento adicional da superfície radicular antes do reimplante, não foi efetivo na estimulação do reparo periodontal. O grupo 4 (FGF) apresentou na maioria dos espécimes um tecido conjuntivo delgado e desorganizado, sem a presença de fibras do ligamento periodontal, e quando estas fibras estavam presentes, não eram reinseridas à superfície radicular. Além disto, ao mensurarmos as fibras colágenas pelo método histoquímico picrossírius, este grupo apresentou quantidade bem menor de fibras colágenas tipo I, inclusive não diferindo estatisticamente do grupo controle negativo (C-). Por outro lado, este grupo apresentou uma incidência de reabsorção substitutiva e anquilose maior do

que o grupo controle positivo (C+) e o laser (LA). Uma possível explicação para este desempenho insatisfatório no grupo FGF é a ocorrência de um reparo competitivo da superfície radicular danificada, favorecendo mais os osteoblastos do endósteo do que os fibroblastos do ligamento periodontal, resultando eventualmente na reabsorção por substituição (Lam & Sae-Lim, 2004).

Quando a aplicação do FGF-2 foi associada ao tratamento da superfície radicular com laser de diodo (LA+FGF), ficou evidente a redução da porcentagem de reabsorção na análise radiográfica. Na análise histológica, processos reabsortivos foram observados, porém, apresentaram baixa incidência quando comparados ao grupo controle negativo (C-), corroborando mais uma vez, a efetividade do laser diodo. Ao compararmos o valor das médias de fibras colágenas coradas pelo método de coloração Picrosírius Red, este grupo foi o que apresentou a maior quantidade de fibras colágenas do tipo I, se assemelhando estatisticamente ao grupo controle positivo (C+), fortalecendo a afirmação de que o FGF-2 é um mitógeno potente para as células periodontais (Murakami, 2011).

A regeneração periodontal promovida pelo FGF-2 já foi alvo de várias pesquisas tanto em doença periodontal em humanos quanto sobre defeitos ósseos criados em cavidades simuladas nas raízes de animais. Os resultados foram promissores, e se verificou nestes sítios uma neoformação de cimento, neoformação óssea e regeneração do ligamento periodontal (Tabata et al., 1998; Takayama et al., 2001; Murakami et al., 2003; Kitamura et al., 2011).

Existem poucos estudos sobre a utilização do FGF-2 com o intuito de reparar o periodonto dos dentes avulsionados e reimplantados. Sae-Lim et al. (2004) realizaram um estudo histológico em dentes de macacos reimplantados tardiamente, preenchendo o alvéolo e a raiz previamente com 0.1ml de Solução de FGFb

recombinante (400µg/ml) ou 40µg de FGFb recombinante + 0,1ml de matriz de fibrina. Os resultados mostraram que embora os grupos do FGF-2 tenham mostrado algum tipo de reparo, diferiu estatisticamente do grupo controle, onde houve um completo reparo, com a presença de tecido conjuntivo periodontal interposto entre o cimento e o osso intacto ou reparado. Os autores salientaram que uma das possíveis causas desse fracasso, pode ter sido o veículo que foi utilizado, uma vez que a cola de fibrina não promove a liberação ideal do FGF-2.

Não obstante, em nosso trabalho, utilizamos carreadores com as características dos polímeros hidrofílicos como a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), pois a sua capacidade de responder à presença de água e formar uma camada de gel são essenciais para controlar a liberação destas matrizes. Seshima et al. (2010) procederam a análise histológica e imuno-histoquímica da associação de 200µg FGF2 gel + HPC nas raízes de dentes de cães reimplantados, e foram observadas as fibras do ligamento periodontal inseridas no osso e no cimento neoformado, restabelecendo uma orientação funcional do aparato de sustentação nestes grupos experimentais.

A efetividade da ação dos fatores de crescimento de fibroblastos também pode ser influenciada pela presença de bactérias, células necrosadas e processos inflamatórios (Yun et al., 2010). A irradiação com laser de diodo no grupo (LA+FGF) deve ter propiciado um ambiente adequado com a eliminação desses agentes indesejáveis, potencializando a atividade dos FGF-2, diferentemente da aplicação isolada do FGF-2 (grupo FGF). Além disto, em dois espécimes foi observada a reinserção das fibras periodontais ao cimento no grupo (LA+FGF). Isto também pode ter sido influenciado pela ação do laser, uma vez que Raldi et al (2010)

demonstrou que o laser diodo com os mesmos parâmetros utilizados no presente estudo favoreceu a adesão celular à superfície cementária.

A engenharia tecidual surge como um campo novo e promissor na busca da excelência da regeneração dos tecidos. O mecanismo da engenharia tecidual é estruturado sobre uma tríade composta de células, fatores de crescimento e uma matriz (Murakami, 2011). Zhou et al. (2012) fabricaram camadas celulares de células tronco do ligamento periodontal e aplicaram sobre a superfície radicular de dentes de cães antes do reimplante. Os resultados mostraram que esse sistema de entrega de camadas celulares teve potencial para regenerar os tecidos periodontais, razão pela qual pode representar uma nova terapia para os dentes reimplantados. Os autores, contudo, fizeram uma ressalva de que o cimento e o ligamento periodontal neoformado não foram contínuos, com uma ocorrência de reparo desfavorável de cerca de 10%, além disso, esta técnica requer equipamento e laboratório específicos e dispendiosos.

Assunção et al. (2011), baseados nos resultados promissores com a utilização do plasma rico em plaquetas (PRP) em associação com as células-tronco, procuraram avaliar seu desempenho sobre a superfície radicular dos dentes avulsionados de cães. As análises histológicas, histomorfométrica e imuno-histoquímica sugeriram que as plaquetas ativadas com Trombina tiveram um papel importante na redução de reabsorção substitutiva, além de favorecer um reparo tecidual, devido à presença de grandes concentrações de fatores de crescimento. Entretanto, os autores sugeriram novos estudos para testar outros materiais, uma vez que PRP/Ca não representou uma matriz adequada para as células indiferenciadas no tratamento dos dentes avulsionados.

Embora não tenhamos logrado uma completa regeneração em todos os espécimes, os resultados obtidos com este experimento nos encorajam a realizar outros trabalhos com intuito de estimular a reparação integral do tecido de sustentação e eliminar as reabsorções externas que ocorrem nos reimplantes tardios. Os espécimes que não apresentaram completa reparação neste estudo podem ser justificados pela possibilidade de que algumas áreas da superfície radicular não terem sido cobertas completamente pelo FGF-2, resultando na ativação e migração de osteoclastos que poderiam causar anquilose e reabsorção substitutiva o que também foi observado por Zhou et al (2012).

Outra justificativa plausível por não termos obtido a reinserção das fibras do ligamento periodontal em todos os espécimes, foi a utilização apenas de fatores de crescimento de fibroblastos na estimulação das células remanescentes da parede alveolar. Nos casos de reimplante tardio, a agressão ao tecido de sustentação é muito grande, havendo uma escassez de células do ligamento periodontal tanto no cimento quanto no alvéolo (Sato et al., 2010). Desta forma, talvez pudéssemos obter uma resposta melhor se além do FGF-2, fossem associadas células tronco indiferenciadas para complementar a formação da tríade da engenharia tecidual sugerida por Murakami (2011).

Diante dos resultados satisfatórios encontrados com o protocolo utilizado nesta pesquisa, torna-se clara a importância da realização do tratamento radicular associado aos bioestimuladores do reparo periodontal dos dentes avulsionados e reimplantados tardiamente. Apesar das limitações deste experimento, nossos resultados são promissores e abrem caminhos para novas pesquisas com outros protocolos de utilização e aplicação dos fatores de crescimento de fibroblastos, com a intenção de melhorar o prognóstico dos reimplantes tardios. A bioestimulação

utilizando FGF-2 não requer laboratórios específicos nem técnicas rebuscadas de engenharia tecidual, e merecem ainda alguns refinamentos metodológicos e maiores validações científicas dos achados aqui encontrados através de fases sequenciais deste estudo inédito para o tratamento da avulsão dentária.

7 CONCLUSÃO

Considerando as condições específicas deste experimento, de acordo com a metodologia empregada, com base nos resultados obtidos podemos concluir que a irradiação das superfícies radiculares com laser de diodo de alta potência, associada ou não à aplicação tópica de FGF, previamente ao reimplante tardio, nos parâmetros utilizados neste estudo, reduziu a incidência de reabsorções radiculares externas e de anquilose. Embora uma regeneração completa do LP não tenha sido alcançada, a aplicação tópica do fator de crescimento de fibroblastos (FGF-2) favoreceu o reparo do ligamento periodontal, principalmente quando associado à irradiação com laser de diodo de alta potência.

REFERÊNCIAS¹

1. Andreasen JO, Andreasen FM. Texto e atlas colorido de traumatismo dental. São Paulo: Artmed; 2001. p.770.
2. Andersson L, Al-Asfour A, Al-Jame Q. Knowledge of first aid measures of avulsion and replantation of teeth. An interview study of 221 Kuwaiti schoolchildren. *Dent Traumatol* 2006;22:57–65.
3. Trope M. Avulsion of permanent teeth: theory to practice. *Dent Traumatol* 2011; 27:281-94.
4. 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.
5. Andersson L, Bodin I. Avulsed human teeth replanted within 15 minutes: a long-term clinical follow-up study. *Endod Dent Traumat* 1990; 6:37-42.
6. Kreisler M, Meyer C, Stender E, Daublander M, Willershausen-Zonnchen B, D'hoedt B. Effect of diode laser irradiation on the attachment rate of periodontal ligament cells: an in vitro study. *J Periodontol* 2001; 72:1312-17.
7. Haypek P, Zezell DM, Bachmann L, Marques MM. Interaction between high-power diode laser and dental root surface. Thermal, morphological and biocompatibility analysis. *J Oral Laser Applications* 2006; 6:101-9.
8. Raldi DP, Mello I, Neves AC, Habitante SM, Miyagi SS, Lage-Marques JL. Attachment of cultured fibroblasts and ultrastructural analysis of simulated cervical resorptions treated with high-power lasers and MTA. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 109:e154-61.
9. Carvalho ES, Costa FT, Campos MS, Anbinder AL, Neves AC, 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.
10. Krasner P, Rankow HJ. New philosophy for the treatment of avulsed teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995; 79:616–23.
11. Cochran DL, Wozney JM. Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontology* 2000 1999; 19:40–58.
12. Okamoto T, Yatsuzuka N, Tanaka Y, Kan M, Yamanaka T, Sakamoto A et al. Growth and differentiation of periodontal ligament-derived cells in serum-free defined culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1997; 33:302-09.
13. Shimazu A, Bachchu MA, Morishita M, Noshiro M, Kato Y, Iwamoto Y. Expression of syndecan-2, -4, and fibroblast growth factor receptor type 1 in human

¹Referências elaboradas de acordo com o modelo Vancouver

periodontal ligament fibroblasts and down-regulation of these membrane proteins during maturation in culture. *J Dent Res* 1999; 78:1791-9.

14. Takayama S, Murakami S, Miki Y, Ikezawa K, Tasaka S, Terashima A, Asano T, Okada H. Effects of basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res* 1997; 32:667-75.

15. Sae-Lim V, Ong WY, Li Z, Neo J. The effect of basic fibroblast growth factor on delayed-replanted monkey teeth. *J Periodontol* 2004; 75:1570-8.

16. Stavropoulos A, Wikesjo UME. Growth and differentiation factors for periodontal regeneration: a review on factors with clinical testing. *J Periodont Res* 2012; 47:545-53.

17. Takayama S, Murakami S, Shimabukuro Y, Kitamura M, Okada H. Periodontal regeneration by FGF-2 (bFGF) in primate models. *J Dent Res* 2001; 80:2075-9.

18. Murakami S, Takayama S, Kitamura M, Shimabukuro Y, Yanagi K, Ikezawa K et al. Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs. *J Periodontal Res* 2003; 38:97-110.

19. Kitamura M, Akamatsu M, Machigashira M, Hara Y, Sakagami R, Hirofuji T et al. FGF-2 stimulates periodontal regeneration: results of a multi-center randomized clinical trial. *J Dent Res* 2011; 90:35-40.

20. Murakami S. Periodontal tissue regeneration by signaling molecule(s): what role does basic fibroblast growth factor (FGF-2) have in periodontal therapy? *Periodontol* 2000 2011; 56:188-208.

21. Sato Y, Kikuchi M, Ohata N, Tamura M, Kuboki Y. Enhanced cementum formation in experimentally induced cementum defects of the root surface with the application of recombinant basic fibroblast growth factor in collagen gel in vivo. *J Periodontol* 2004; 75:243-8.

22. Seshima F, Ota M, Kinumatsu T, Shibukawa Y, Yamada S. Effect of recombinant basic fibroblast growth factor on reimplanted teeth in beagle dogs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 109:142-8.

23. Barret EJ, Kenny DJ. Avulsed permanent teeth: a review of the literature and treatment guidelines. *Endod Dent Traumatol* 1997; 13:153-63.

24. Levin L, Bryson EC, Caplan D, Trope M. Effect of topical alendronate on root resorption of dried replanted dog teeth. *Dent Traumatol* 2001; 17:120-6.

25. Poi WR, Carvalho RM, Panzarini SR, Sonoda CK, Manfrin TM, Rodrigues TS. Influence of enamel matrix derivate (Emdogain) and sodium fluoride on the healing process in delayed tooth replantation: histologic and histometric analysis in rats. *Dent Traumatol* 2007; 23:35-41.

26. Zervas P, Lambrianidis T, Karabouta-Vulgaropoulou I. The effect of citric acid treatment on periodontal healing after replantation of permanent teeth. *Int Endod J* 1991; 24:317-25.
27. Panzarini SR, Carvalho ACP, Poi WR, Sonoda CK. Use of vitamin C in delayed tooth replantation. *Braz Dent J* 2005; 16:17-22.
28. Gulinelli JL, Panzarini SR, Fattah CMRS, Poi WR, Sonoda CK, Negri MR, et al. Effect of root surface treatment with propolis and fluoride in delayed tooth replantation in rats. *Dent Traumatol* 2008; 24:651-7.
29. Moreira Neto JJS. Avaliação histológica do efeito do timerosal incolor ou da rifamida no tratamento da superfície radicular de dentes de rato com necrose do ligamento periodontal reimplantados experimentalmente [Tese de doutorado]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Odontologia, 2002. 155p.
30. Mori GG, Garcia RB. Microscopic study of the effect of root surface treatment with acetazolamida in avulsed and replanted rat teeth. *J Appl Oral Sci* 2002; 10:180-5.
31. Keum KY, Kwon OT, Spangberg LS, Kim CK, Kim J, Cho MI et al. Effect of dexamethasone on root resorption after delayed replantation of rat tooth. *J Endod* 2003; 29:810-3.
32. Lustosa-Pereira AL, Garcia RB, Moraes IG, Bernardineli N, Bramante CM, Bortoluzzi EA. Evaluation of the topical effect of alendronate on the root surface of extracted and replanted teeth. Microscopic analysis on rat's teeth. *Dent Traumatol* 2006; 22:30-5.
33. Mori GG, Moraes IG, Garcia RB, Borro LCB, Purificação BR. Microscopic Investigation of the use of gallium nitrate for root surface treatment in rat teeth submitted to delayed replantation. *Braz Dent J* 2007; 18:198-201.
34. Lam K, Sae-Lim V. The effect of Emdogain gel on periodontal healing in replanted monkeys' teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97:100-7.
35. Schjott M, Andreasen JO. Emdogain does not prevent progressive root resorption after replantation of avulsed teeth: a clinical study. *Dent Traumatol* 2005; 21:46-50.
36. Barrett EJ, Kenny DJ, Tenenbaum HC, Sigal MJ, Johnston DH. Replantation of permanent incisors in children using Emdogain. *Dent Traumatol* 2005; 21:269-75.
37. Gutknecht N, Franzen R, Schippers M, Lampert F. Bactericidal effect of a 980-nm diode laser in the root canal wall dentin of bovine teeth. *J Clin Laser Med Surg* 2004; 22:9-13.

38. Romanos G, Nentwig GH. Diode laser (980nm) in oral and maxillofacial surgical procedures: clinical observations based on clinical applications. *J Clin Laser Med Surg* 1999; 17:193-7.
39. De Souza EB, Cai S, Simionato MRL, Lage-Marques JL. High-power diode laser in the disinfection in depth of the root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 106:e68-72.
40. Moritz A, Gutknecht N, Schoop U, Goharkay K, Doertbudak O, Sperr W. Irradiation of infected root canals with a diode laser in vivo: Results of microbiological examinations. *Lasers Surg Med* 1997; 21:221-6.
41. Friedman S, Komorowski R, Maillet W, Nguyen HQ, Torneck CD. Susceptibility of Nd:YAG laser – irradiated root surfaces in replanted teeth to external inflammatory resorption. *Endod Dent Traumatol* 1998; 14:225-31.
42. Theodoro LH, Sampaio JE, Haypek P, Bachmann L, Zezell DM, Garcia VG. Effect of Er:YAG and Diode lasers on the adhesion of blood components and on the morphology of irradiated root surfaces. *J Periodontal Res* 2006; 41:381-90.
43. Raldi DP, Miyagi SP, Lage-Marques JLS, Marques MM. Aderência celular e alterações estruturais em reabsorções radiculares após irradiação com lasers de alta potência. *Braz Oral Res* 2006; 20(Supl):217.
44. Hamaoka L, Moura-Netto C, Marques MM, Moura AAM. Biocompatibility of Human Dental Root Surfaces. *Photomed Laser Surg* 2009; 27:715-20.
45. Sato K, Muramatsu T, Tsuchiya Y, Masaoka T, Enokiya Y, Hashimoto S et al. Proliferation, migration and apoptosis of periodontal ligament cells after tooth replantation. *Oral Dis* 2010; 16:263-8.
46. Bartold PM, Raben A. Growth factor modulation of fibroblasts in simulated wound healing. *J Periodontal Res* 1996; 31:205-16.
47. Ramseier CA, Rasperini G, Batia S, Giannobile WV. Advanced reconstructive technologies for periodontal tissue repair. *Periodontol 2000* 2012; 59:185-202.
48. Nevins M, Camelo M, Nevins ML, Schenk RK, Lynch SE. Periodontal regeneration in humans using recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) and allogenic bone. *J Periodontol* 2003; 74:1282–92.
49. Miyaji H, Sugaya T, Ibe K, Ishizuka R, Tokunaga K, Kawanami M. Root surface conditioning with bone morphogenetic protein-2 facilitates cementum-like tissue deposition in beagle dogs. *J Periodontal Res* 2010; 45:658-63.
50. Callens A. Growth factors in periodontal regeneration. Berlim: Quintessence books; 1997. p.302.
51. Yun YR, Won JE, Jeon E, Lee S, Kang W, Jo H et al. Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration. *J Tissue Eng* 2010; 1:1-18.

52. Wang Y, Cheung GSP, Xu X, Zhao S, Zhang C. The effect of cultured autologous periodontal ligament cells on the healing of delayed autotransplanted dog's teeth. *J Endod* 2010; 36:264-7.
53. Assunção LRS, Colenci R, Ferreira do-Amaral CC, Sonoda CK, Mogami Bomfim SR, Okamoto R et al. Periodontal tissue engineering after tooth replantation. *J Periodontol* 2011; 82:758-66.
54. Zhou Y, Li Y, Mao L, Peng H. Periodontal healing by periodontal ligament cell sheets in a teeth replantation model. *Arch Oral Biol* 2012; 57:169-76.
55. Saito CT, 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.
56. Kreisler M, Kohnen W, Beck M, Al Haj H, Christoffers AB, Götz H, et al. Efficacy of NaOCl/H₂O₂ irrigation and GaAlAs laser in decontamination of root canals in vitro. *Lasers Surg Med* 2003; 32:189-96.
57. Mori GG, Garcia RB, Moraes IG. Morphometric and microscopic evaluation of the effect of solution of acetazolamide as an intracanal therapeutic agent in late reimplanted rat teeth. *Dent Traumatol* 2006; 22:36-40.
58. Tronstad L, Andreasen JO, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. PH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod* 1981; 7:17-21.
59. Trope M, Moshonov J, Nissan R, Buxt P, Yesilsoy C. Short VS. long-term calcium hydroxide treatment of established inflammatory root resorption in replanted dog teeth. *Endod Dent Traumatol* 1995; 11:124-8.
60. McIntyre JD, Lee JY, Trope M, Vann WF Jr. Permanent tooth replantation following avulsion: Using a decision tree to achieve the best outcome. *Pediatric Dentistry* 2009; 31:137-44.
61. Kim YT, Park JC, Choi SH, Cho KS, Im GI, Kim BS et al. The dynamic healing profile of human periodontal ligament stem cells: histological and immunohistochemical analysis using an ectopic transplantation model. *J Periodontal Res.* 2012; 47:514-24.
62. Panzarini SR, Okamoto R, Poi WR, Sonoda CK, Pedrini D, da Silva PE et al. Histological and immunohistochemical analyses of the chronology of healing process after immediate tooth replantation in incisor rat teeth. *Dent Traumatol* 2013; 29:15-22.
63. De Macedo MF. Estudo descritivo do desenvolvimento do ligamento periodontal em ratos. [Dissertação de Mestrado]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual de Campinas; 2001.
64. Newman MG, Carranza FA, Carranza FA. Periodontia clínica. São Paulo: Elsevier; 2007. p.1328

65. Tabata Y, Yamada K, Miyamoto S, Nagata I, Kikuchi H, Aoyama I et al. Bone regeneration by basic fibroblast growth factor complexed with biodegradable hydrogels. *Biomaterials*. 1998; 19:807-15.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Resultados da análise estatística sobre % médias das áreas de reabsorção entre os grupos pelo teste Kruskal-Wallis, com nível de significância 5%

	Resultados			
H =	18.8449			
Graus de liberdade =		4		
(p) Kruskal-Wallis =	0.0008			
R 1 =	166.5000			
R 2 =	372.0000			
R 3 =	202.5000			
R 4 =	188.0000			
R 5 =	346.0000			
R 1 (posto médio) =	16.6500			
R 2 (posto médio) =	37.2000			
R 3 (posto médio) =	20.2500			
R 4 (posto médio) =	18.8000			
R 5 (posto médio) =	34.6000			
Comparações (método de Dunn)	Dif. Postos	z calculado	z crítico	p
Postos médios 1 e 2	20.5500	3.1522	2.807	< 0.05
Postos médios 1 e 3	3.6000	0.5522	2.807	ns
Postos médios 1 e 4	2.1500	0.3298	2.807	ns
Postos médios 1 e 5	17.9500	2.7534	2.807	ns
Postos médios 2 e 3	16.9500	2.6000	2.807	ns
Postos médios 2 e 4	18.4000	2.8224	2.807	< 0.05
Postos médios 2 e 5	2.6000	0.3988	2.807	ns
Postos médios 3 e 4	1.4500	0.2224	2.807	ns
Postos médios 3 e 5	14.3500	2.2012	2.807	ns
Postos médios 4 e 5	15.8000	2.4236	2.807	ns

APÊNDICE B – Resultados da análise estatística dos números de áreas de reabsorção entre os grupos pelo teste ANOVAs, com nível de significância 5%

DISTRIBUIÇÃO NORMAL

-

ANOVA

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	4	41.320	10.330
Erro	45	45.900	1.020

F =	10.1275
(p) =	< 0.0001
Média (Coluna 1) =	1.9000
Média (Coluna 2) =	4.0000
Média (Coluna 3) =	1.7000
Média (Coluna 4) =	1.5000
Média (Coluna 5) =	2.6000

Tukey:	Diferença	Q	(p)
Médias (1 a 2) =	2.1000	6.5754	< 0.01
Médias (1 a 3) =	0.2000	0.6262	ns
Médias (1 a 4) =	0.4000	1.2524	ns
Médias (1 a 5) =	0.7000	2.1918	ns
Médias (2 a 3) =	2.3000	7.2016	< 0.01
Médias (2 a 4) =	2.5000	7.8278	< 0.01
Médias (2 a 5) =	1.4000	4.3836	< 0.05
Médias (3 a 4) =	0.2000	0.6262	ns
Médias (3 a 5) =	0.9000	2.8180	ns
Médias (4 a 5) =	1.1000	3.4442	ns

APÊNDICE C – Resultados da análise estatística da reabsorção substitutiva entre os grupos pelo teste Kruskal-Wallis, com nível de significância 5%

resultado	
G1XG2	\$
G1XG3	ns
G1XG4	ns
G1XG5	ns
G2XG3	\$
G2XG4	ns
G2XG5	ns
G3XG4	ns
G3XG5	ns
G4XG5	ns

Resultado	Amostr: 2	Amostra 2
Tamanho de:	21	21
Soma dos F	346.0	557.0
Mediana =	0.00	3.00
U =	115.00	
Z(U) =	2.6539	
p-valor (uni)	0.0040	
p-valor (bil)	0.0080	

Resultado	Amostr: 3	Amostra 3
Tamanho de:	21	21
Soma dos F	441.0	462.0
Mediana =	0.00	0.00
U =	210.00	
Z(U) =	0.2641	
p-valor (uni)	0.3958	
p-valor (bil)	0.7917	

Resultado	Amostr: 4	Amostra 4
Tamanho de:	21	24
Soma dos F	435.5	593.5
Mediana =	0.00	0.00
U =	204.50	
Z(U) =	1.0807	
p-valor (uni)	0.1399	
p-valor (bil)	0.2798	

Resultado	Amostr: 5	Amostra 5
Tamanho de:	21	20
Soma dos F	395.0	466.0
Mediana =	0.00	0.00
U =	164.00	
Z(U) =	1.1938	
p-valor (uni)	0.1151	
p-valor (bil)	0.2302	

Resultado	Amostr: 3	Amostra 3
Tamanho de:	21	21
Soma dos F	546.5	356.5
Mediana =	3.00	0.00
U =	125.50	
Z(U) =	2.3898	
p-valor (uni)	0.0084	
p-valor (bil)	0.0169	

Resultado	Amostr: 4	Amostra 4
Tamanho de:	21	24
Soma dos F	563.0	466.0
Mediana =	3.00	0.00
U =	166.00	
Z(U) =	1.9566	
p-valor (uni)	0.0252	
p-valor (bil)	0.0504	

Resultado	Amostr: 5	Amostra 5
Tamanho de:	21	20
Soma dos F	504.5	356.5
Mediana =	3.00	0.00
U =	146.50	
Z(U) =	1.6562	
p-valor (uni)	0.0488	
p-valor (bil)	0.0977	

Resultado	Amostr: 4	Amostra 4
Tamanho de:	21	24
Soma dos F	447.5	587.5
Mediana =	0.00	0.00
U =	216.50	
Z(U) =	0.8077	
p-valor (uni)	0.2096	
p-valor (bil)	0.4193	

Resultado	Amostr: 5	Amostra 5
Tamanho de:	21	20
Soma dos F	405.0	456.0
Mediana =	0.00	0.00
U =	174.00	
Z(U) =	0.3390	
p-valor (uni)	0.1739	
p-valor (bil)	0.3478	

Resultado	Amostr: 5	Amostra 5
Tamanho de:	24	20
Soma dos F	527.5	462.5
Mediana =	0.00	0.00
U =	227.50	
Z(U) =	0.2946	
p-valor (uni)	0.3841	
p-valor (bil)	0.7683	

APÊNDICE D – Resultados da análise estatística da reabsorção inflamatória entre os grupos pelo teste Kruskal-Wallis, com nível de significância 5%

resultado					
G1xG2	\$				
G1xG3	ns				
G1xG4	ns				
G1xG5	ns				
G2xG3	\$				
G2xG4	ns				
G2xG5	ns				
G3xG4	ns				
G3xG5	ns				
G4xG5	ns				

Resultado	Amostr 1	Amostr 2
Tamanho	21	21
Soma de	359.0	544.0
Median	0.00	1.00
U =	128.00	
Z(U) =	2.3269	
p-valor	0.0100	
p-valor	0.0200	

Resultado	Amostr 1	Amostr 3
Tamanho	21	20
Soma de	436.5	424.5
Median	0.00	0.00
U =	205.50	
Z(U) =	0.1174	
p-valor	0.4533	
p-valor	0.3066	

Resultado	Amostr 1	Amostr 4
Tamanho	21	24
Soma de	455.5	579.5
Median	0.00	0.00
U =	224.50	
Z(U) =	0.6256	
p-valor	0.2658	
p-valor	0.5315	

Resultado	Amostr 1	Amostr 5
Tamanho	21	20
Soma de	407.0	454.0
Median	0.00	0.00
U =	176.00	
Z(U) =	0.8868	
p-valor	0.1876	
p-valor	0.3752	

Resultado	Amostr 1	Amostr 3
Tamanho	21	20
Soma de	521.0	340.0
Median	1.00	0.00
U =	130.00	
Z(U) =	2.0866	
p-valor	0.0185	
p-valor	0.0363	

Resultado	Amostr 1	Amostr 4
Tamanho	21	24
Soma de	565.0	470.0
Median	1.00	0.00
U =	170.00	
Z(U) =	1.8656	
p-valor	0.0311	
p-valor	0.0621	

Resultado	Amostr 1	Amostr 5
Tamanho	21	20
Soma de	497.0	364.0
Median	1.00	0.00
U =	154.00	
Z(U) =	1.4606	
p-valor	0.0721	
p-valor	0.1441	

Resultado	Amostr 1	Amostr 4
Tamanho	20	24
Soma de	430.5	559.5
Median	0.00	0.00
U =	220.50	
Z(U) =	0.4536	
p-valor	0.3229	
p-valor	0.6458	

Resultado	Amostr 1	Amostr 5
Tamanho	20	20
Soma de	383.0	437.0
Median	0.00	0.00
U =	173.00	
Z(U) =	0.7304	
p-valor	0.2326	
p-valor	0.4652	

Resultado	Amostr 1	Amostr 5
Tamanho	24	20
Soma de	527.0	463.0
Median	0.00	0.00
U =	227.00	
Z(U) =	0.3064	
p-valor	0.3796	
p-valor	0.7593	

APÊNDICE E – Resultados da análise estatística da anquilose entre os grupos pelo teste Kruskal-Wallis, com nível de significância 5%

		resultado	
		G1XG2	S
		G1XG3	ns
		G1XG4	ns
		G1XG5	ns
		G2XG3	S
		G2XG4	S
		G2XG5	S
		G3XG4	ns
		G3XG5	ns
		G4XG5	ns

Resultado	Amostra 1	Amostra 2	Resultado	Amostr 1	Amostr 2
Tamanho da an	21	21	Tamanho da	21	21
Soma dos Pos	346.0	557.0	Soma dos P	440.0	463.0
Mediana =	0.00	3.00	Mediana =	0.00	0.00
U =	115.00		U =	209.00	
Z(U) =	2.6539		Z(U) =	0.2893	
p-valor (unilat)	0.0040		p-valor (unil	0.3862	
p-valor (bilate)	0.0080		p-valor (bils	0.7724	

Resultado	Amostra 1	Amostra 4	Resultado	Amostr 1	Amostr 4
Tamanho da an	21	24	Tamanho da	21	24
Soma dos Pos	433.0	602.0	Soma dos P	395.0	466.0
Mediana =	0.00	0.00	Mediana =	0.00	0.00
U =	202.00		U =	164.00	
Z(U) =	1.1375		Z(U) =	1.1938	
p-valor (unilat)	0.1277		p-valor (unil	0.1151	
p-valor (bilate)	0.2553		p-valor (bils	0.2302	

Resultado	Amostra 1	Amostra 3	Resultado	Amostr 1	Amostr 3
Tamanho da an	21	21	Tamanho da	21	21
Soma dos Pos	546.5	356.5	Soma dos P	569.0	466.0
Mediana =	3.00	0.00	Mediana =	3.00	0.00
U =	125.50		U =	166.00	
Z(U) =	2.3898		Z(U) =	1.9566	
p-valor (unilat)	0.0084		p-valor (unil	0.0252	
p-valor (bilate)	0.0169		p-valor (bils	0.0504	

Resultado	Amostra 1	Amostra 5	Resultado	Amostr 1	Amostr 5
Tamanho da an	21	20	Tamanho da	21	20
Soma dos Pos	521.0	340.0	Soma dos P	447.5	587.5
Mediana =	3.00	0.00	Mediana =	0.00	0.00
U =	130.00		U =	216.50	
Z(U) =	2.0866		Z(U) =	0.8077	
p-valor (unilat)	0.0185		p-valor (unil	0.2096	
p-valor (bilate)	0.0369		p-valor (bils	0.4193	

Resultado	Amostra 1	Amostra 5	Resultado	Amostr 1	Amostr 5
Tamanho da an	21	20	Tamanho da	24	20
Soma dos Pos	408.0	453.0	Soma dos P	532.0	458.0
Mediana =	0.00	0.00	Mediana =	0.00	0.00
U =	177.00		U =	232.00	
Z(U) =	0.8607		Z(U) =	0.1886	
p-valor (unilat)	0.1947		p-valor (unil	0.4252	
p-valor (bilate)	0.3894		p-valor (bils	0.8504	

APÊNDICE F – Resultados da análise estatística do tecido conjuntivo entre os grupos pelo teste Kruskal-Wallis, com nível de significância 5%

		Resultados			
H =		21.6712			
Graus de liberdade =		4			
(p) Kruskal-Wallis =		0.0002			
R 1 =		1313.5000			
R 2 =		609.5000			
R 3 =		714.5000			
R 4 =		954.5000			
R 5 =		968.0000			
R 1 (posto médio) =		69.1316			
R 2 (posto médio) =		30.4750			
R 3 (posto médio) =		47.6333			
R 4 (posto médio) =		43.3864			
R 5 (posto médio) =		50.9474			
Comparações (método de Dunn)	Dif. Postos	z calculado	z crítico	p	
Postos médios 1 e 2	38.6566	4.3770	2.807	< 0.05	
Postos médios 1 e 3	21.4982	2.2578	2.807	ns	
Postos médios 1 e 4	25.7452	2.9819	2.807	< 0.05	
Postos médios 1 e 5	18.1842	2.0331	2.807	ns	
Postos médios 2 e 3	17.1583	1.8222	2.807	ns	
Postos médios 2 e 4	12.9114	1.5159	2.807	ns	
Postos médios 2 e 5	20.4724	2.3180	2.807	ns	
Postos médios 3 e 4	4.2470	0.4601	2.807	ns	
Postos médios 3 e 5	3.3140	0.3480	2.807	ns	
Postos médios 4 e 5	7.5610	0.8757	2.807	ns	

APÊNDICE G – Resultados da análise estatística da reinserção do ligamento periodontal entre os grupos pelo teste Kruskal-Wallis, com nível de significância 5%

		Resultados			
H =		26.4667			
Graus de liberdade =		4			
(p) Kruskal-Wallis =		< 0.0001			
R 1 =		1353.0000			
R 2 =		624.0000			
R 3 =		642.0000			
R 4 =		884.0000			
R 5 =		962.0000			
R 1 (posto médio) =		71.2105			
R 2 (posto médio) =		31.2000			
R 3 (posto médio) =		45.8571			
R 4 (posto médio) =		40.1818			
R 5 (posto médio) =		50.6316			
Comparações (método de Dunn)	Dif. Postos	z calculado	z crítico	p	
Postos médios 1 e 2	40.0105	4.5782	2.807	< 0.05	
Postos médios 1 e 3	25.3534	2.6387	2.807	ns	
Postos médios 1 e 4	31.0287	3.6318	2.807	< 0.05	
Postos médios 1 e 5	20.5789	2.3251	2.807	ns	
Postos médios 2 e 3	14.6571	1.5419	2.807	ns	
Postos médios 2 e 4	8.9818	1.0657	2.807	ns	
Postos médios 2 e 5	19.4316	2.2235	2.807	ns	
Postos médios 3 e 4	5.6753	0.6085	2.807	ns	
Postos médios 3 e 5	4.7744	0.4969	2.807	ns	
Postos médios 4 e 5	10.4498	1.2231	2.807	ns	

APÊNDICE H – Resultados da análise estatística da quantidade das fibras colágenas (Picosírius Red) entre os grupos pelo teste Kruskal-Wallis, com nível de significância 5%

H =	48.2867
Graus de liberdade =	4
(p) Kruskal-Wallis =	< 0.0001
R 1 =	2533.0000
R 2 =	880.0000
R 3 =	1511.0000
R 4 =	1525.5000
R 5 =	1678.5000
R 1 (posto médio) =	93.8148
R 2 (posto médio) =	38.2609
R 3 (posto médio) =	47.2188
R 4 (posto médio) =	56.5000
R 5 (posto médio) =	93.2500

Comparações (método de Dunn)	Dif. Postos	z calculado	z crítico	p
Postos médios 1 e 2	55.5539	5.3194	2.807	< 0.05
Postos médios 1 e 3	46.5961	4.8447	2.807	< 0.05
Postos médios 1 e 4	37.3148	3.7250	2.807	< 0.05
Postos médios 1 e 5	0.5648	0.0504	2.807	ns
Postos médios 2 e 3	8.9579	0.8903	2.807	ns
Postos médios 2 e 4	18.2391	1.7464	2.807	ns
Postos médios 2 e 5	54.9891	4.7475	2.807	< 0.05
Postos médios 3 e 4	9.2813	0.9650	2.807	ns
Postos médios 3 e 5	46.0313	4.2449	2.807	< 0.05
Postos médios 4 e 5	36.7500	3.2814	2.807	< 0.05
Postos médios 2 e 5	54.5326	4.9816	2.807	< 0.05
Postos médios 3 e 4	26.2781	2.6503	2.807	ns
Postos médios 3 e 5	45.7031	4.4594	2.807	< 0.05
Postos médios 4 e 5	19.4250	1.7188	2.807	ns

ANEXO**ANEXO A – Parecer do comitê de ética em pesquisa**

PRPPG-Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação
Comissão de Ética no Uso de Animais
Rua Visconde do Rio Branco, 210 Centro Taubaté-SP 12020-040
Tel.: (12) 3625.4143 – 3635.1233 Fax: (12) 3632.2947
ceua@unitau.br

DECLARAÇÃO Nº 003/11

Protocolo CEUA/UNITAU nº 004/11 (Esse número de registro deverá ser citado pelo pesquisador nas correspondências referentes a este projeto)

Projeto de Pesquisa: *Efeitos da utilização do laser de diodo e de fatores de crescimento na regeneração do ligamento periodontal em reimplantes tardios: análise histológica e imuno-histoquímica em ratos.*

Pesquisador(a) Responsável: Erica dos Santos Carvalho

A Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade de Taubaté, em reunião de **24/02/2011**, e no uso das competências definidas na Deliberação CONSEP Nº 013/10, considerou o Projeto acima **Aprovado**.

Taubaté, 18 de abril de 2011

Profa. Ms. Marisa Cardoso
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial desta obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Erica dos Santos Carvalho

Taubaté, abril de 2013.