

**DANIELA AUGUSTA BARBATO FERREIRA**

**REABSORÇÕES RADICULARES EXTERNAS INFLAMATÓRIAS EM  
DENTES PERMANENTES REIMPLANTADOS:  
Determinantes Clínicos e Epigenéticos**

**Faculdade de Odontologia  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
2020**

Daniela Augusta Barbato Ferreira

**REABSORÇÕES RADICULARES EXTERNAS INFLAMATÓRIAS EM  
DENTES PERMANENTES REIMPLANTADOS:  
Determinantes Clínicos e Epigenéticos**

Tese apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Odontologia - área de concentração em Endodontia

**Orientadora: Profa. Dra. Juliana Vilela Bastos**

**Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez**

Belo Horizonte  
2020

## Ficha Catalográfica

F383r Ferreira, Daniela Augusta Barbato.  
2020 Reabsorções radiculares externas inflamatórias em dentes  
T permanentes reimplantados : determinantes clínicos e  
epigenéticos / Daniela Augusta Barbato Ferreira. -- 2020.

124 f. : il.

Orientadora: Juliana Vilela Bastos.  
Coorientador: Ricardo Santiago Gomez.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de Minas Gerais,  
Faculdade de Odontologia.

1. Reimplante dentário. 2. Avulsão dentária. 3.  
Epigenômica. 4. Metilação de DNA. I. Bastos, Juliana Vilela.  
II. Gomez, Ricardo Santiago. III. Universidade Federal de  
Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**



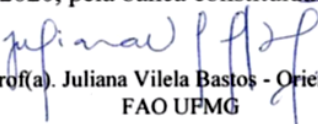
## FOLHA DE APROVAÇÃO

**REABSORÇÕES RADICULARES EXTERNAS INFLAMATÓRIAS EM DENTES PERMANENTES REIMPLANTADOS: Determinantes Demográficos, Clínicos e Genéticos**

**DANIELA AUGUSTA BARBATO FERREIRA**

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em ODONTOLOGIA, área de concentração ENDODONTIA.

Aprovada em 10 de janeiro de 2020, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof(a). Juliana Vilela Bastos - Orientador  
FAO UFMG

  
Prof(a). Maria Ilma de Souza Cortes  
PUC Minas

  
Prof(a). Francine Benetti  
Universidade Federal de Minas Gerais

  
Prof(a). Renata Gonçalves de Resende  
Faculdade Padre Arnaldo Jansen

  
Prof(a). José Leonardo Barbosa Melgaço da Costa  
Faculdade Padre Arnaldo Jansen

Belo Horizonte, 10 de janeiro de 2020.

*Dedico esta trabalho à minha família, meus pais e irmãos, pelo incentivo e apoio durante esta jornada. Obrigada por terem compreendido cada dificuldade e ausência e por possibilitarem a transformação de meus ideais em realidade. Vocês foram (e continuam sendo) os meus primeiros grandes exemplos. Agradeço especialmente ao meu marido, Fabrício, pela retaguarda serena e compreensiva, pelo amor, carinho e paciência fundamentais para que eu alcançasse esse objetivo, por suportar as ausências e as chatices e por estar sempre ao meu lado.*

***A todos vocês, o meu amor e a minha sincera gratidão.***

# Agradecimentos

Agradecimento especial aos mestres desta jornada:

Profa. Dra. Juliana Vilela Bastos, agradeço de coração por ter conduzido os meus primeiros passos na pesquisa com amizade e entusiasmo, enfatizando a importância da ética, da lealdade e da dedicação. Pelos anos de sincera amizade, apoio constante e pela inigualável generosidade em transmitir seus conhecimentos. O seu incansável incentivo é decisivo na minha formação e pilar do meu crescimento pessoal e profissional.

Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez, agradeço imensamente por disponibilizar sua equipe e colocar sua infraestrutura, sabedoria e expertise à disposição deste projeto. Obrigada pela oportunidade e confiança, pelas orientações, ensinamentos e apoio fundamentais.

Prof. Enrico Antônio Colosimo pela disponibilidade, delicadeza e habilidade com que orientou as análises estatísticas desta tese, conferindo-lhes excelência e precisão. Obrigada por generosamente disponibilizar sua equipe, seu tempo e seus conhecimentos para realização desta importantíssima etapa do trabalho.

Profa. Dra. Maria Ilma Souza Côrtes, que acompanhou minha trajetória desde muito cedo, igualmente me inspirando e colaborando de forma significativa em minha formação profissional.

À Fatinha, amiga e companheira sincera, agradeço por sua imensa disponibilidade em ajudar, pelo incentivo constante, pelo exemplo de profissional dedicada e competente e pela inestimável amizade.

A todos os colegas e professores do Programa de Pós-graduação da UFMG, que de braços abertos me receberam. Agradeço pelos saberes compartilhados, pelo companheirismo constante e pelos laços de amizade que estreitamos ao longo destes anos de estudo, em especial aos queridos amigos Gustavo, Luíza, Robertinha e Sylvia.

Aos companheiros do Laboratório de Biologia Celular pelas ajuda e pelas orientações. Agradecimento especial à Sara pela delicadeza e pelo auxílio e disponibilidade na execução dos experimentos.

Ao Programa de Traumatismos Dentários da FAO-UFMG, seus alunos, bolsistas e voluntários, pacientes e à Cris. Todos representam parte essencial da metodologia deste trabalho. Obrigada pela valiosa colaboração, por me acolher e por gentilmente colocarem sua experiência à disposição da ciência e por estarem presentes sempre que solicitado. A vocês, meu respeito e gratidão.

Enfim, agradeço a Deus, pela oportunidade de encontrar pessoas tão especiais e pela dádiva desse enorme aprendizado!

*“É bom encarar de frente o que se concretizou e fazer as pazes com o que ficou apenas no esboço. Seria um tédio olhar para trás e achar sentido em tudo, mas é bem vivo sentir que fiz daquilo que tinha em mãos o melhor que pude...*

*... porque no final das contas, grande não é o que se compara, é quem se supera.”*

**Fernanda Gaona**

## RESUMO

A reabsorção radicular externa inflamatória (RREI) é um processo patológico definido como a perda progressiva de tecido mineralizado radicular, dentina e cimento, resultante da combinação entre a lesão às camadas protetoras da superfície externa da raiz e a presença de microrganismos no interior do sistema de canais radiculares. Estudos clínicos demonstraram o papel da idade e de fatores relacionados ao manejo e tratamento do dente avulsionado na etiopatogenia e evolução das RREI após reimplantes. Entretanto, não existem informações sobre a interação destes fatores, bem como poucos estudos avaliaram a influência do perfil genético e imunológico do paciente no padrão de cicatrização após reimplantes dentários. O presente estudo objetivou (1) avaliar a interação de fatores prognósticos para o desenvolvimento da RREI após o reimplante de dentes permanentes, bem como (2) investigar o papel da epigenética nos processos imunomediados das RREI pós-traumáticas. Para estudo dos determinantes clínicos e suas interações, o universo da pesquisa envolveu 427 pacientes (idade média de 12,6 anos) portadores de 581 dentes permanentes reimplantados, com rizogênese completa no momento do trauma, tratados na Clínica de Traumatismos dentários da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais entre 1994 e 2018. Dados relativos à idade do paciente no momento do trauma, grau de rizogênese, condições de armazenamento e período extra alveolar do dente avulsionado, uso de antibioticoterapia sistêmica, tempo decorrido entre o reimplante e o início da terapia endodôntica radical (TER) e a duração do período de imobilização foram coletados dos prontuários dos pacientes. Tomadas radiográficas realizadas na consulta de início do TER foram utilizadas para diagnóstico da atividade de reabsorção. Sinais radiográficos de RREI foram encontrados em 80,7% da amostra (469 dentes). Os resultados demonstraram que a idade do paciente no momento do trauma e o tempo decorrido até o início do TER representaram importantes fatores prognósticos para a ocorrência de RREI. Além disso foi observada uma interação quantitativa entre estas duas variáveis uma vez que o aumento na idade do paciente atenuou significativamente o efeito do tempo até o início da terapia endodôntica. Este resultado inédito evidencia a maior vulnerabilidade do paciente mais jovem e enfatiza a importância de se considerar estas duas covariáveis conjuntamente durante a tomada de decisão clínica. Para o estudo epigenético, o perfil de metilação do DNA de 22 genes envolvidos na resposta imune foi avaliado em um *pool* de 08 amostras de fragmentos radiculares de dentes reimplantados portadores de RREI, indicados para exodontia. O grupo controle consistiu em um *pool* de 06 amostras de tecido ósseo saudável coletado durante a extração cirúrgica de dentes impactados. Os padrões de metilação do DNA dos 22 genes foram quantificados utilizando *EpiTect Methyl II Signature Human Cytokine Production PCR Array*. Os resultados do estudo da epigenética revelou que o *pool* de amostras com RREI apresentou nível mais alto de metilação do DNA na região promotora da FOXP3, em comparação com o *pool* de osso normal (65,95% e 23,43%, respectivamente). Esta é a primeira evidência de uma possível participação de eventos epigenéticos na modulação da RREI e especula-se se o padrão hipermetilado da FOXP3 poderia estar relacionado à presença da infecção endodôntica.

**Palavras-chave:** Reimplante dentário. Reabsorção radicular externa inflamatória. Epigenética, Metilação do DNA

## ABSTRACT

### **Evaluation of Clinical Determinants and DNA Methylation profile in Inflammatory External Root Resorption in Replanted Permanent Teeth**

Inflammatory external root resorption (IERR) is a pathological process defined as the progressive loss of root mineralized tissue, dentin and cement, resulting from both: damage to the protective layers in the root external surface and the presence of endodontic infection inside the root canal. Clinical studies have demonstrated the role of age and factors related to the management and treatment of avulsed teeth in the etiopathogenesis and progression of RREI. However, there is no information on the interaction of these factors and few studies have evaluated the influence of the patient's genetic and immunological profile on the healing pattern after dental replantation. The present study aimed to (1) evaluate the interaction of prognostic factors for the development of RREI after replantation of permanent teeth, as well as (2) to investigate the role of epigenetics in the immunomediated processes of post-traumatic RREI. To study the clinical determinants and their interactions, the sample comprised 427 patients (mean age 12.6 years) with 581 replanted mature permanent teeth treated at the Dental Trauma Clinic of the Faculty of Dentistry from the Federal University of Minas Gerais between 1994 and 2018. Patients' records were evaluated to collect data such as patient's age at the time of the trauma, storage conditions and extra alveolar period of the avulsed tooth, systemic antibiotic therapy prescription, time elapsed between reimplantation and onset of endodontic therapy (TER) and splinting timing. The presence and index of IERR was assessed radiographically at the visit of pulpectomy. Radiographic signs of IEER were found in 80.7% of the sample (469 teeth) and were absent in 19.7% of cases (112 teeth). The results showed that the patient's age at the time of the trauma and the time that elapsed until the beginning of TER represented important prognostic factors for the occurrence of RREI. In addition, a quantitative interaction was observed between these two variables since the increase in the patient's age significantly attenuated the effect of time until the beginning of endodontic therapy. This is an original result that highlights the greater vulnerability of the younger patients and emphasizes the importance of considering these two covariates together during clinical decision-making. For the epigenetic study, the DNA methylation profile of 22 genes involved in the immune response was evaluated in a pool of 08 samples of root fragments of replanted teeth with RREI, referred to extraction. The control group consisted of a pool of 06 samples of healthy bone tissue collected during surgical extraction of impacted teeth. The DNA methylation pattern was quantified using EpiTect Methyl II Signature Human Cytokine Production PCR Array. The results of the epigenetics study revealed that the sample pool with RREI showed a higher level of DNA methylation in the FOXP3 promoter region, compared to the normal bone pool (65.95% and 23.43%, respectively). This is the first evidence of a possible participation of epigenetic events in the modulation of RREI and it is speculated whether the hypermethylated pattern of FOXP3 could be related to the presence of endodontic infection.

**Keywords:** Tooth replantation. Inflammatory external root resorption. Epigenetics. DNA methylation

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| <b>FIGURA 1:</b> Mecanismo de inibição da transcrição gênica por meio da metilação do DNA.....                     | 20 |
| <b>FIGURA 2:</b> Desenho esquemático do critério para cálculo do índice radiográfico de reabsorção.....            | 27 |
| <b>FIGURA3:</b> Procedimentos <i>Epítec</i> ® <i>Methyl II Signature Human Cytokine Production PCR Array</i> ..... | 32 |
| <b>TABELA 1:</b> Composição do painel de genes humanos analisados relacionados à resposta imune.....               | 30 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATS - Antibioticoterapia Sistêmica

CG - dinucleotídeo citosina-guanina

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG

CTD - Clínica de Traumatismos Dentários

CG - Dinucleotídeo de citosina e guanina

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

gDNA - DNA genômico

GEE - Equações de Estimação Generalizadas (do inglês *Generalized Estimated Equations*)

HMOB - Hospital Metropolitano Odilon Bherens

DNMT - DNA metiltransferase

FAO-UFMG - Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais

LP - Ligamento periodontal

MICE - *Multiple Imputation by Chained Equations*

MBD - Proteína de ligação a CG metilado (do inglês *Molecular Binding Domain*)

Ms - Enzima sensível a metilação

Md - Enzima dependente de metilação

Msd - Enzimas sensível e dependente de metilação (dupla digestão)

Mo - Tratamento sem enzimas de restrição

PCR - Reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

RRE - Reabsorção Radicular Externa

RREI - Reabsorção Radicular Externa Inflamatória

RRES - Reabsorção Radicular Externa por Substituição

SCR - Sistema de Canais Radiculares

SNP - Polimorfismo de Nucleotídeo Único (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*)

TALE - Termo de Assentimento Livre e Esclarecido

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TCUD - Termo de Compromisso de Utilização de Dados

## SUMÁRIO

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....</b>                                   | <b>14</b> |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS.....</b>  | <b>22</b> |
| 2.1      | Objetivo Geral .....   | 23        |
| 2.2      | Objetivos Específicos .....  | 23        |
| <b>3</b> | <b>METODOLOGIA EXPANDIDA.....</b>                                    | <b>24</b> |
| 3.1      | FASE I: ESTUDO DOS DETERMINANTES CLÍNICOS DA OCORRÊNCIA DE RREI..... | 25        |
| 3.1.1    | Seleção da amostra .....   | 25        |
| 3.1.2    | Aspectos Éticos .....  | 25        |
| 3.1.3    | Diagnóstico de RREI.....   | 26        |
| 3.1.4    | Análise Estatística.....   | 27        |
| 3.2      | FASE II: ESTUDO DO PERFIL DE METILAÇÃO DO DNA.....                   | 28        |
| 3.2.1    | Grupos amostrais e obtenção das amostras.....                        | 28        |
| 3.2.2    | Extração do DNA .....  | 29        |
| 3.2.3    | Digestão Enzimática e Análise do perfil de metilação do DNA.....     | 29        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>4</b> | <b>ARTIGOS CIENTÍFICOS SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO.....</b>             | <b>33</b> |
| 4.1      | Artigo submetido 01.....   | 34        |
| 4.2      | Artigo submetido 02.....   | 50        |
| <b>5</b> | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>                                      | <b>64</b> |
| 5.1      | Avaliação dos Determinantes Clínicos da ocorrência de RREI.....        | 65        |
| 5.2      | Avaliação do Perfil de Metilação do DNA na RREI.....                   | 67        |
|          | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                | <b>69</b> |
|          | <b>ANEXOS.....</b>   | <b>77</b> |
|          | ANEXO 1: Termos de Consentimento/Assentimento Livre e Esclarecido..... | 78        |
|          | ANEXO 2: Termo de Compromisso de Utilização de Dados (TCUD).....       | 104       |
|          | ANEXO 3: Parecer Consubstanciado do CEP.....                           | 107       |
|          | ANEXO 4: Produção científica durante o curso:                          |           |
|          | Artigo publicado 01.....   | 112       |
|          | Artigo publicado 02 .....  | 119       |

## 1. Considerações Iniciais

## 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

As Reabsorções Radiculares Externas pós-traumáticas (RRE) - Reabsorção Radicular Externa por Substituição (RRES) e Reabsorção Radicular Externa Inflamatória (RREI) - constituem-se a sequela mais frequente após o reimplante de dentes permanentes avulsionados, com prevalências relatadas na literatura entre 13% e 94% (SOUZA *et al.*, 2018). A lesão à camada cementoblástica e às fibras do ligamento periodontal (LP), decorrentes do evento traumático e das condutas emergenciais e clínicas adotadas no momento do acidente, são os fatores desencadeantes que estabelecem condições propícias à atividade reabsortiva, uma vez que expõe as áreas mineralizadas da raiz à ação das células clásticas. No entanto, a ação destas células sob a superfície radicular requer estimulação contínua, ou seja, na ausência de um fator de manutenção que continuamente mantenha o estímulo para osteoclastogênese, a reabsorção radicular será transitória e o reparo tecidual poderá ocorrer pela aposição de fibras periodontais recém-formadas e cimento reparador nas lacunas reabsortivas (HAMMARSTRÖM *et al.*, 1989; TRONSTAD, 1988).

Na etiopatogenia da RRES, a perda do LP e da camada cementoblástica resulta em união direta do osso alveolar com a superfície radicular. Ao perder a camada cementoblástica e uma vez cessada a inflamação inicial responsável pela remoção dos restos necróticos do LP, a superfície radicular desnuda é colonizada por osteoblastos e osteoclastos, normalmente presentes no osso medular, que competem para repovoá-la. A superfície dentinária da raiz passa assim a integrar o processo de remodelação óssea fisiológica, culminando em reabsorção e substituição progressiva da estrutura radicular por tecido ósseo (HAMMARSTRÖM *et al.*, 1989).

No caso das RREI, a camada de cimento e cemento intermediárias atingidas pela reabsorção iniciada durante os processos de reparo do ligamento periodontal acaba por expor os túbulos dentinários. Considerando que a necrose pulpar é esperada na maioria dos casos de avulsão dentária e que o tecido pulpar necrosado é extremamente susceptível a contaminação microbiana, a exposição da superfície externa da raiz ao ambiente intracanal infectado propicia uma via de acesso para bactérias e suas toxinas atinjam a superfície externa da raiz. A combinação de

microrganismos presentes no interior do sistema de canais radiculares (SCR) com o dano à camada cementoblástica na superfície externa da raiz resulta em RREI que pode ser bastante grave e levar a uma rápida perda do elemento dental (ANDREASEN AND HJØRTING-HANSEN, 1966; HAMMARSTRÖM *et al.*, 1986; BLOMLÖF *et al.*, 1988; TRONSTAD, 1988; TROPE, 2011). A presença da infecção endodôntica representa um estímulo contínuo e progressivo da atividade osteoclástica, amplificando o processo inflamatório, que modifica o curso da resposta tecidual e altera o processo inicial de cicatrização (ANDREASEN AND HJØRTING-HANSEN, 1966a,b; ANDREASEN, 1981a; TROPE, 2011). A participação bacteriana na etiopatogenia da RREI é bem estabelecida e foi observada experimentalmente (ANDREASEN, 1981a,b; HAMMARSTRÖM *et al.*, 1986; NISHIOKA *et al.*, 1998; TROPE *et al.*, 1992) e confirmada clinicamente através da associação direta entre o tempo decorrido até a pulpectomia e o desenvolvimento de RREI (BASTOS *et al.*, 2014; COCCIA, 1980; HINCKFUSS AND MESSER, 2009; KINIRONS *et al.*, 1999; STEWART *et al.*, 2008; WERDER *et al.*, 2011).

A partir do reconhecimento de que a presença de bactérias no ligamento periodontal, nos túbulos dentinários ou na polpa são fatores de risco responsáveis pelo desenvolvimento de RREI, uma abordagem lógica seria excluir ou limitar a carga microbiana durante a fase de cicatrização para otimizar o reparo periodontal. A principal forma de controlar a inflamação decorrente da infecção é através da terapia endodôntica. Outra fonte de infecção, proveniente do ligamento periodontal e alvéolo dentário contaminados, poderia ser controlada pela administração de antibioticoterapia sistêmica (ATS). Estudos experimentais em animais mostraram que a ATS otimiza a cicatrização e diminui a RREI (GOMES *et al.*, 2015; HAMMARSTRÖM *et al.*, 1986; MELO *et al.*, 2016; SAE-LIM *et al.*, 1998a,b). Entretanto, os benefícios da administração da ATS não foram comprovados clinicamente (ANDERSSON AND BODIN, 1990; ANDREASEN AND HJØRTING-HANSEN, 1966a; ANDREASEN *et al.*, 1995; BASTOS *et al.*, 2014; CRONA-LARSSON *et al.*, 1991; HINCKFUSS AND MESSER, 2009; SAE-LIM AND YUEN, 1997).

A idade do paciente no momento do trauma também foi descrita como uma variável importante na progressão e gravidade da RREI. Está bem estabelecido que quanto mais jovem o paciente, maior a taxa de reabsorção (ANDERSSON *et al.*, 1989; BASTOS *et al.*, 2014; PETROVIC *et al.*, 2010). Estágios iniciais do desenvolvimento

radicular também foram relacionados à rápida progressão da RREI (ANDERSSON *et al.*, 1989; ANDREASEN *et al.*, 1995a; KRISTERSON AND ANDREASEN, 1984). Além disso, fatores relacionados ao manejo do dente avulsionado, como seu armazenamento por longos períodos em condições inadequadas também foram associados à ocorrência de RREI após o reimplante (BOYD *et al.*, 2000; KINIRONS *et al.*, 1999; PETROVIC *et al.*, 2010). Há ainda evidência clínica da existência de risco aumentado para desenvolvimento precoce de RREI em casos de fratura coronária concomitante no dente avulsionado (DONALDSON & KINIRONS, 2001).

Entretanto, a influência destes fatores prognósticos clínicos têm sido investigada isoladamente e até o momento não existem informações na literatura sobre como estes diferentes fatores interagem influenciando a atividade de reabsorção. Além disso, existem poucas informações sobre o papel da resposta do hospedeiro na determinação do prognóstico periodontal após o reimplante. Os poucos estudos clínicos disponíveis demonstraram que o processo de cicatrização após o reimplante pode ser influenciado pelo perfil imunológico do paciente, independentemente do manejo e tratamento inicial do dente avulsionado (ROSKAMP *et al.*, 2017).

Evidências sugerem que os mecanismos celulares e moleculares da reabsorção dos tecidos dentários são bastante semelhantes aos da reabsorção óssea, envolvendo células clásticas morfológica e funcionalmente semelhantes aos osteoclastos (PIERCE, 1989; SASAKI, 2003). A osteoclastogênese é um processo resultante de interações complexas entre células, receptores e seus respectivos ligantes, citocinas e fatores de crescimento, sendo o equilíbrio entre a expressão desses componentes considerado o principal mecanismo regulatório da atividade dos osteoclastos (BOYCE AND XING, 2008; BOYLE *et al.*, 2003; KATAGIRI AND TAKAHASHI, 2002; TAKAYANAGI, 2005; TAKAYANAGI, 2012). Estudos *in vivo* confirmaram que a dinâmica da expressão de citocinas osteo-imunomodulatórias tem efetiva participação durante o processo de reparo após o reimplante dental em ratos e está associada com a diferenciação de odontoclastos (MANFRIN *et al.*, 2013; PANZARINI *et al.*, 2013). Um estudo utilizando tecidos perirradiculares de dentes humanos extraídos de pacientes portadores de RREI e RRES após o reimplante dentário demonstrou a expressão de mediadores inflamatórios semelhantes àqueles da reabsorção óssea, sugerindo que fatores locais que comprovadamente atuam nos

processos fisiológicos e patológicos de reabsorção óssea também participam na modulação das RRE (BASTOS *et al.*, 2017).

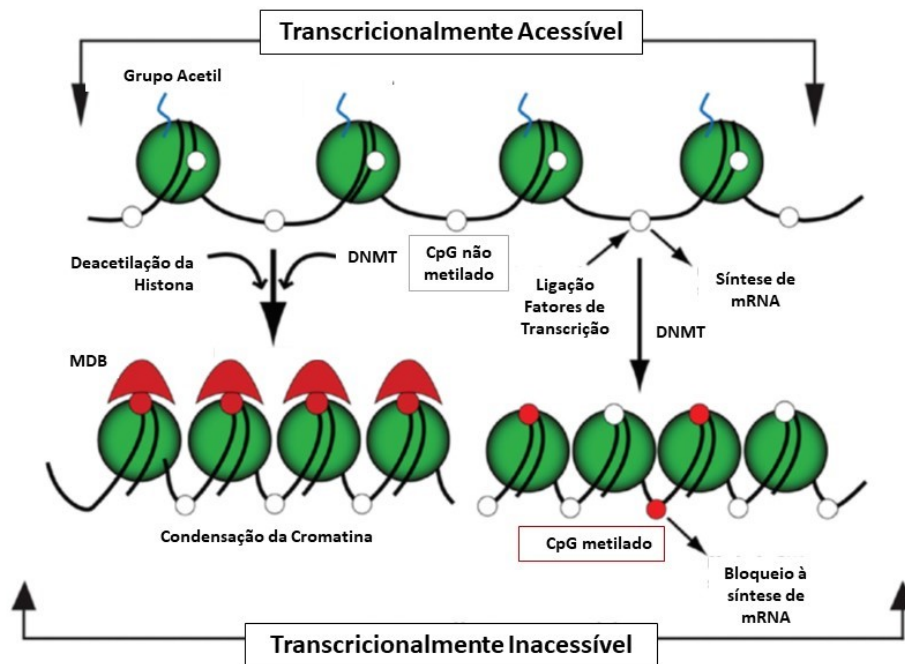
Neste contexto, o principal mecanismo de indução da RREI está relacionado com a capacidade das endotoxinas de bactérias presentes no canal radicular de promover a liberação de fatores desencadeadores da atividade osteoclástica à semelhança do que acontece na reabsorção óssea periapical em resposta à uma infecção endodôntica (GRAVES *et al.*, 2011; NE *et al.*, 1999). Nas lesões periapicais, apesar dos microrganismos e seus subprodutos causarem dano direto por meio de seus fatores de virulência, os danos indiretos provocados pela própria resposta inflamatória/imunológica nos tecidos perirradiculares são os principais responsáveis pela destruição tecidual. Acredita-se que a interação entre antígenos bacterianos e as células de defesa do hospedeiro, células inflamatórias e clásticas, que coletivamente organizam a atividade de enzimas, citocinas e hormônios também sejam determinantes da evolução das reabsorções radiculares (NE *et al.*, 1999; PIERCE, 1989; SASAKI, 2003). As informações sobre a imunopatologia e os mecanismos moduladores das RREI pós-trauma advêm, na sua maioria, de estudos experimentais conduzidos *in vivo* e *in vitro* (AHN *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2016; MANFRIN *et al.*, 2013; PANZARINI *et al.*, 2013; REGO *et al.*, 2011; SAITO *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2003).

A resposta imune de um indivíduo não é influenciada apenas por características genéticas. Há um nível adicional de regulação gênica desencadeada por alterações epigenéticas. Epigenética é definida como modificações herdáveis na expressão do gene que não envolve mudança na sequência de bases nucleotídicas da molécula de DNA (ácido desoxirribonucleico) (GOLDBERG *et al.*, 2007). Através de modificações nas proteínas histonas ou por meio de alterações químicas na própria molécula de DNA, remodelando a cromatina, mecanismos epigenéticos atuam seletivamente ativando ou inativando genes. Representam um tipo de regulação gênica capaz de alterar o comportamento celular, controlando padrões de expressão gênica durante o ciclo celular, desenvolvimento ou diferenciação celular, e que pode interferir na variabilidade interindividual da resposta imune e na suscetibilidade a doenças (LARSSON, 2017; WILSON, 2008).

A metilação do DNA é um dos fenômenos epigenéticos mais extensamente estudado e melhor caracterizado (GREENBERG AND BOURC'HIS, 2019). A

metilação do DNA é caracterizada pela adição covalente de um grupo metil no quinto carbono, ou posição 5' do anel citosina, e é catalisada por enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs). Em mamíferos foram identificadas três DNMTs: DNMT1, DNMT3A e DNMT3B. DNMT3A e DNMT3B são consideradas metiltransferases *de novo*, pois podem estabelecer um novo padrão de metilação para DNA não modificado (OKANO *et al.*, 1999). Por outro lado, o DNMT1 atua durante a replicação do DNA, sendo responsável pela manutenção do padrão de metilação do filamento de DNA parental para o filamento recém-sintetizado. Após a replicação do DNA, as duas hélices filhas do DNA hemi-metilado contém uma fita metilada e uma fita não metilada. A DNMT1 metila as fitas recém sintetizadas reestabelecendo o padrão de metilação do DNA parental, assegurando a transferência fiel deste padrão durante as divisões celulares, sendo assim considerada uma metiltransferase de manutenção (HERMANN *et al.*, 2004).

Em mamíferos, a metilação ocorre principalmente em dinucleotídeos CG (citosina-guanina) ou CpG que são regiões de citosina e guanina ligadas por um grupo de fosfato. Ilhas CpG são extensões de DNA de aproximadamente 1000 pares de bases as quais apresentam uma densidade CpG maior que o restante do genoma. Cerca de 70% dos genes promotores residem em ilhas CpG (MOORE *et al.*, 2013). Dinucleotídeos CG metilados interferem diretamente na ligação dos fatores de transcrição às suas sequências de reconhecimento. Além disso, regiões do DNA metilado adjacente aos sítios promotores dos genes atuam como um sinal de recrutamento para proteínas de ligação (MBDs), as quais competem com os fatores de transcrição, resultando na repressão transcricional. Estas proteínas de ligação (MBDs) por sua vez associam-se a grandes complexos de proteínas contendo corepressores e histonas deacetilases. A deacetilação da histona é um mecanismo responsável por remover grupos acetil, levando ao enovelamento do DNA. Isto resulta em uma cromatina mais compacta a qual é transcricionalmente inacessível. Assim, o silenciamento gênico provocado pela metilação do DNA ocorre diretamente bloqueando a ligação dos fatores de transcrição ao DNA e indiretamente, uma vez que citosinas metiladas tendem a recrutar histonas deacetilases, favorecendo a condensação do DNA e conseqüente alteração na estrutura da cromatina (ATTWOOD *et al.*, 2002; BARROS AND OFFENBACHER, 2009) (Figura 01).



**Figura 01: Mecanismo de inibição da transcrição gênica por meio da metilação do DNA.**

Fonte: Adaptado de Barros and Offenbacher (2009)

Evidências apontam que genes de citocinas envolvidas no processo imunológico são alvos de múltiplos eventos epigenéticos, incluindo metilação do DNA e modificações de histonas (FITZPATRICK AND WILSON, 2003; NIELSEN AND TOST, 2013). A própria resposta inflamatória por si só é capaz de influenciar mudanças epigenéticas nas células, levando à repressão ou ativação transcricional de múltiplos genes alvo. Em outras palavras, os mecanismos epigenéticos desempenham um papel fundamental na iniciação e progressão da inflamação pela determinação dos perfis de citocinas em resposta a estímulos ambientais, mas também pela regulação dos genes alvo em resposta às citocinas produzidas no microambiente (BAYARSAIHAN, 2011).

Nesse sentido, o papel da inflamação crônica como um potencial estímulo para alterar o padrão de metilação local fornece uma área fértil para investigação. No campo da odontologia, pesquisas atuais demonstraram o envolvimento da metilação do DNA em genes que codificam para citocinas envolvidas no processo inflamatório na patogênese da doença periodontal (DE FARIA AMORMINO *et al.*, 2013; DE

SOUZA *et al.*, 2014; LARSSON *et al.*, 2015; LARSSON, 2017; LI *et al.*, 2018; LINDROTH AND PARK, 2013; SCHULZ *et al.*, 2016; VIANA *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2013). De forma semelhante, diferenças no perfil de metilação de genes relacionados à resposta imune parecem ter influência sobre a susceptibilidade individual às lesões periapicais inflamatórias, tais como cistos e granulomas, e no resultado ao tratamento, através da sua contribuição para expressão alterada de genes envolvidos na doença (CAMPOS *et al.*, 2013; CAMPOS *et al.*, 2015; CAMPOS *et al.*, 2016; WICHNIESKI *et al.*, 2019). Até o momento, não existem informações sobre o papel da regulação epigenética na modulação da resposta imune inflamatória do hospedeiro e sua interferência no processo de cicatrização de dentes portadores de lesões traumáticas dento-alveolares.

Cabe ressaltar ainda que patógenos microbianos, incluindo bactérias, vírus e seus fatores de virulência, podem atuar induzindo alterações epigenéticas com a intenção de contornar os mecanismos de defesa do hospedeiro, favorecendo a colonização, o crescimento ou a disseminação microbiana (NILLER *et al.*, 2013). O papel da infecção bacteriana e da inflamação tecidual na modulação epigenética de algumas doenças orais foi recentemente explorado, as quais mostraram-se capazes de induzir modificações epigenéticas nos tecidos pulpare (HUI *et al.*, 2017; MO *et al.*, 2019) e periodontais (DRURY AND CHUNG, 2015; HOLLA AND BALAJI, 2015; LUO *et al.*, 2018). Dessa forma, o estudo de padrões epigenéticos pode fornecer informações valiosas sobre como as células respondem à presença de patógenos endodônticos, contribuindo para a melhor compreensão dos mecanismos imunoregulatórios na progressão da RREI.

Considerando-se a importância da regulação imunológica nos processos de reabsorção dos tecidos mineralizados, a escassez de informações específicas sobre o perfil imunoinflamatório do indivíduo na modulação das RREI pós-traumáticas, e tendo como parâmetro a participação de eventos epigenéticos em outros processos inflamatórios de interesse odontológico, especula-se se estes mecanismos também estariam relacionados à patogênese das RREI em dentes reimplantados após a avulsão dentária. Estudos desta natureza são de grande relevância, pois podem contribuir para compreensão das diferenças interindividuais observadas clinicamente e, dessa forma, orientar estratégias terapêuticas específicas.

## 2. Objetivos

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral:

Avaliar a atividade de RREI após o reimplante de dentes permanentes avulsionados bem como sua associação com determinantes clínicos e epigenéticos.

### 2.2 Objetivos específicos:

2.2.1 Avaliar a presença e extensão de RREI em dentes permanentes maduros reimplantados após avulsão traumática.

2.2.2 Avaliar a associação entre a atividade de RREI e possíveis determinantes tais como a idade do paciente no momento do trauma, as condições de armazenamento e período extra alveolar dos dentes avulsionados, o tempo decorrido entre o reimplante e o início da terapia endodôntica, o uso de antibioticoterapia sistêmica no momento do reimplante, a duração do período de imobilização e a presença de fratura coronária concomitante no dente avulsionado.

2.2.3 Avaliar o padrão de metilação dos genes *BCL10*, *BCL3*, *FOXP3*, *HMOX1*, *IL12A*, *TRAF6*, *MALT1*, *SOD1*, *MAP3K7*, *TRAF2*, *STAT5A*, *INHA*, *INHBA*, *GATA3*, *IRF1*, *SMAD3*, *IGF2BP2*, *ELA2*, *LTB*, *MYD88*, *NOD1* e *TLR2* em dentes permanentes reimplantados após avulsão traumática com diagnóstico de RREI e comparar com tecido ósseo normal.

3. Metodologia

Expandida

### **3 METODOLOGIA EXPANDIDA**

#### **3.1 FASE I: ESTUDO DOS DETERMINANTES CLÍNICOS DA OCORRÊNCIA RREI**

##### **3.1.1 Seleção da amostra:**

O presente estudo consistiu em uma avaliação transversal da atividade de RREI em dentes permanentes reimplantados de pacientes atendidos na Clínica de Traumatismos Dentários da Faculdade de Odontologia da UFMG (CTD-FAO-UFMG) entre 1994 e 2018. Foram excluídos pacientes que apresentavam alterações sistêmicas debilitantes e/ou usuários de fármacos capazes de modificar a resposta inflamatória padrão do indivíduo ou interferir no metabolismo ósseo. Para este estudo foram incluídos na amostra somente dentes com completo desenvolvimento radicular e ápice fechado no momento do reimplante. Além disso, os pacientes não poderiam apresentar alterações periapicais de origem endodôntica ou periodontal não relacionadas à reabsorção radicular pós-traumática, lesões traumáticas prévias no elemento avulsionado, presença de restaurações extensas e sinais radiográficos de reabsorção radicular ou tratamento endodôntico radical anterior ao evento traumático que tenha desencadeado o processo reabsortivo.

Foram revisados registros de um total de 1288 dentes avulsionados e reimplantados de 871 pacientes. Após a aplicação dos critérios de exclusão, a amostra final constituiu-se de 427 pacientes portadores de 581 dentes permanentes reimplantados, com rizogênese completa no momento do trauma

##### **3.1.2 Aspectos Éticos:**

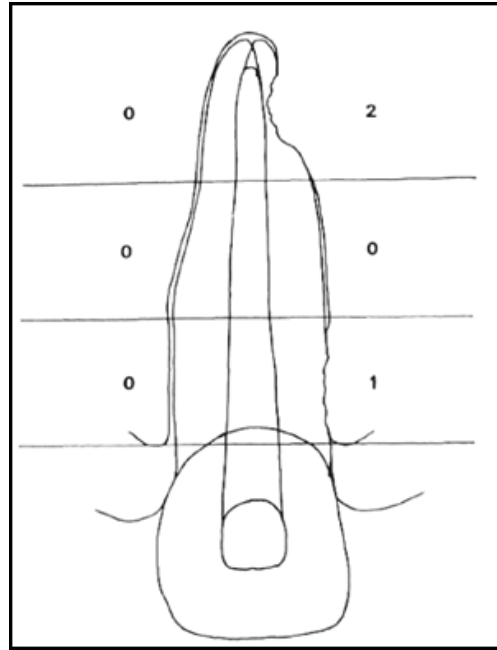
Os pacientes ou os representantes legais daqueles menores de idade selecionados foram informados sobre os objetivos do estudo, tendo a oportunidade de esclarecer quaisquer dúvidas. Foi solicitada a leitura e assinatura do termo de consentimento livre esclarecido e/ou termo de assentimento livre esclarecido (TCLE e/ou TALE – Anexo 1) pelo paciente ou responsável caso concordasse em participar. O paciente também foi informado que durante qualquer etapa do projeto de pesquisa ele teria o direito de desistir e não sofreria nenhuma penalização, nem seriam

interrompidos os procedimentos necessários para o término do seu tratamento. Adicionalmente, os pesquisadores envolvidos assinaram o Termo de Compromisso de Utilização de Dados (TCUD – Anexo 2) para a salvaguarda os direitos daqueles participantes em que houve impossibilidade de obtenção do TCLE/TALE. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética de pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP UFMG – Anexo 3) (CAAE 11883119.9.0000.5149), obedecendo ao exigido pela legislação brasileira, conforme as resoluções do Conselho Nacional de Saúde sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos (Resolução CNS 466/12),.

### 3.1.3 Diagnóstico da RREI:

Para diagnóstico da reabsorção radicular, radiografias periapicais realizadas imediatamente após o reimplante e no início da terapia endodôntica foram examinadas em condições ideais por dois examinadores e de forma independente (JVB e DABF). A RREI foi diagnosticada quando a superfície radicular do dente reimplantado apresentasse áreas radiolúcidas em forma de concha ao longo da superfície da raiz e no osso alveolar adjacente, de acordo com critérios descritos na literatura (ANDREASEN *et al.*, 1995b).

Para estudo da atividade de reabsorção, utilizou-se o índice radiográfico de reabsorção radicular descrito por Andersson *et al.*(1989). Para cálculo do índice, as superfícies mesial e distal da raiz foram divididas em três seções iguais a partir do nível da crista óssea até o ápice. A cada seção da raiz foi atribuída uma pontuação (0, 1 ou 2), dependendo da presença e profundidade das cavidades de reabsorção a partir da superfície externa da raiz até a cavidade pulpar (Figura.02). As pontuações de cada seção foram somadas para se calcular o índice de reabsorção radicular em cada radiografia. Assim, cada radiografia examinada recebeu uma pontuação referente à atividade de reabsorção total. Os índices atribuídos variaram entre 0 a 12.



**Figura 02: Desenho esquemático do critério para cálculo do índice radiográfico de reabsorção: Critérios para pontuação da profundidade da cavidade de reabsorção a partir da superfície externa da raiz nos terços apical, médio e cervical das faces mesial e distal da raiz: 0= ausência de reabsorção, espaço do LP normal; 1= profundidade da lacuna de reabsorção  $\leq$  metade da distância entre a superfície externa da raiz e a cavidade pulpar; 2= profundidade da lacuna de reabsorção  $>$  metade da distância entre a superfície externa da raiz e a cavidade pulpar.**

Fonte: ANDERSSON *et al.* (1989).

### 3.1.4 Análise Estatística:

Um modelo de regressão multinomial ordinal foi utilizado para testar o efeito das covariáveis idade do paciente no momento do trauma, condições de armazenamento e duração do período extra alveolar do dente avulsionado, tempo decorrido entre o reimplante e o início da terapia endodôntica, uso de antibioticoterapia sistêmica no momento do reimplante, duração do período de imobilização e a presença de fratura coronária concomitante no dente avulsionado na ocorrência e extensão de RREI. Para esse fim, os índices radiográficos da atividade de reabsorção foram agrupados em quatro categorias, da seguinte forma: Ausente (índice=0), Leve (índices de 1 a 4), Moderado (índices de 5 a 8) e Grave (índices de 9 a 12). Para cada variável explicativa, um modelo de regressão univariada foi ajustado, e aquelas com valores de  $p < 0,25$  seguiram para a análise multivariada. A interação entre as covariáveis que permaneceram significativas no modelo multivariado final também foi avaliada incluindo um termo de interação multiplicativa. O método

de equações de estimação generalizadas (GEE) foi usado, considerando-se a correlação potencial nos casos em que mais de um dente foi reimplantado no mesmo paciente. Como faltavam dados para a prescrição de ATS, foi realizada uma imputação múltipla através do método *Multiple Imputation by Chained Equations* (MICE), para que indivíduos com informações ausentes pudessem ser incluídos na análise. A estatística Kappa foi usada para estimar a concordância inter e intra examinador para a avaliação dos índices de RRE. A análise estatística foi realizada utilizando *software* R (R Core Team, Versão 3.5.3, 2018, Viena, Áustria). O nível de significado foi fixado em  $p < 0.05$ .

## **3.2 FASE II: ESTUDO DO PERFIL DE METILAÇÃO DO DNA**

### **3.2.1 Grupos amostrais e obtenção das amostras:**

#### **- Grupo Caso**

Para realização do ensaio, foram selecionados 06 indivíduos portadores de 08 dentes reimplantados após avulsão traumática que apresentavam evidência radiográfica de RREI e com indicação de exodontia. O critério para indicação da exodontia baseou-se no índice radiográfico da atividade de reabsorção (dentes com índices radiográficos de 9 a 12). Os dentes foram submetidos à exodontia na clínica de Traumatismos Dentários, da Faculdade de Odontologia da UFMG. A coroa dentária foi separada da raiz e os fragmentos radiculares, bem como o material curetado do alvéolo obtidos durante o procedimento cirúrgico, foram acondicionado em criotubos estéreis e armazenados a seco a  $-80^{\circ}\text{C}$  até processamento das amostras.

#### **- Grupo Controle:**

Para o grupo controle foram selecionados 06 pacientes saudáveis com indicação de remoção de terceiro molar incluso. Fragmentos de osso medular sadio removidos durante os procedimentos de osteotomia foram coletados, acondicionados e armazenados da mesma forma que os do grupo caso. A quantidade de amostras inserida em cada grupo foi determinada de acordo com a disponibilidade de material biológico para realização dos experimentos propostos. Os indivíduos do grupo controle eram saudáveis e não apresentavam distúrbios ósseos.

### 3.2.2 Extração do DNA:

Para realização do ensaio, as amostras foram trituradas em homogeneizador (Fisher Scientific\* PowerGen\* Model 1000) e centrifugadas. A digestão do tecido foi feita com a enzima Proteinase K (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) *overnight*. O DNA genômico (gDNA) foi isolado utilizando o kit *DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA), segundo as instruções do fabricante. A qualidade e quantidade de gDNA foi avaliada por espectrofotometria em equipamento NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), com leitura da absorbância nos comprimentos de ondas  $A_{260}$  e  $A_{280}$ . As amostras contendo DNA extraído foram armazenadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da realização dos experimentos.

### 3.2.3 Digestão Enzimática e Análise do perfil de metilação do DNA:

Com as amostras de DNA extraído e quantificado foram feitos 2 *pools* contendo uma concentração final de gDNA de  $1\ \mu\text{g}/\text{pool}$ : (1): RREle (2) tecido ósseo normal. Todos os pacientes contribuíram com a mesma quantidade de DNA para composição do *pool*.

Após preparo dos *pools*, foi feita avaliação do perfil de metilação em um painel de 22 genes alvos envolvidos com resposta imune (Tabela.01) utilizando o kit *EpiTectMethyl II Signature Human Cytokine Production PCR Array* (SABiosciences, Qiagen, Valencia, CA/Cat. Nº: 335212 EAHS-541ZE), de acordo com as recomendações do fabricante.

Tabela 01: Composição do painel de genes humanos analisados relacionados à resposta imune.

Fonte: QUIAGEN, 2015

| <b>GENES</b>                                | <b>FUNÇÃO</b>  |
|---|--|
| <b><i>4BCL10</i></b>                        | Regulador da função de células T; Regulador da função de células B; Regulador de transcrição; Desenvolvimento e estímulo da resposta celular; Sinalizador molecular na produção de citocinas;                        |
| <b><i>BCL3</i></b>                          | Regulador da função de células T; Regulador da função de células B; Regulador de transcrição; Regulador de tradução; Desenvolvimento e estímulo da resposta celular; Sinalizador molecular na produção de citocinas; |
| <b><i>FOXP3</i></b>                         | Regulador da função de células T; Regulador de transcrição; Desenvolvimento e estímulo da resposta celular; Sinalizador molecular na produção de citocinas;  |
| <b><i>HMOX1, IL12A, TRAF6</i></b>           | Regulador da função de células T; Desenvolvimento e estímulo da resposta celular;  |
| <b><i>MALT1, SOD 1</i></b>                  | Regulador da função de células T; Desenvolvimento e estímulo da resposta celular; Sinalizador molecular na produção de citocinas;  |
| <b><i>MAP3K7, TRAF 2</i></b>                | Regulador da função de células T; Sinalizador molecular na produção de citocinas;  |
| <b><i>STAT5A</i></b>                        | Regulador da função de células T; Regulador da função de células B; Regulador de transcrição; Desenvolvimento e estímulo da resposta celular; Sinalizador molecular na produção de citocinas;                        |
| <b><i>INHA, INHBA</i></b>                   | Regulador da função de células B; Desenvolvimento e estímulo da resposta celular; Sinalizador molecular na produção de citocinas;;   |
| <b><i>GATA3</i></b>                         | Regulador de transcrição; Desenvolvimento e estímulo da resposta celular;  |
| <b><i>IRF1</i></b>                          | Regulador de transcrição;  |
| <b><i>SMAD3</i></b>                         | Regulador de transcrição; Desenvolvimento e estímulo da resposta celular; Sinalizador molecular na produção de citocinas;  |
| <b><i>IDF2BP2</i></b>                       | Regulador de tradução;   |
| <b><i>ELA2, LTB, MYD88, NOD1 e TLR2</i></b> | Desenvolvimento e estímulo da resposta celular; Sinalizador molecular na produção de citocinas;  |

O método empregado pelo sistema é baseado na detecção quantitativa de DNA após a clivagem por enzima de restrição sensível à metilação e/ou enzima de restrição dependente de metilação, as quais digerem o DNA não metilado e metilado, respectivamente. O tratamento enzimático com enzima sensível a metilação (Ms) seletivamente digere cópias de DNA não metilado e parcialmente metilado. Consequentemente, a quantidade de DNA remanescente dessa reação representa a

fração de DNA metilado. Em contraste, a digestão enzimática realizada pela enzima dependente de metilação (Md) digere cópias de DNA metilado e, dessa forma, determina a fração de DNA não metilado. A quantidade de remanescente de DNA em cada reação enzimática é normalizada pela quantidade total de DNA inicial indicada pela fração de DNA tratado sem enzima (Mo). A dupla digestão (Msd) determina a fração de DNA inicial que não é susceptível a digestão pelas enzimas de restrição.

Assim, cada *pool* foi aliquoteado em quatro frações iguais que correspondem às quatro diferentes digestões enzimáticas de restrição independentes: 1) digestão sem enzima (Mo), 2) digestão sensível a metilação (Ms), 3) digestão dependente de metilação (Md) e 4) digestão sensível e dependente de metilação ou dupla digestão (Msd) (Figura.03). Foi utilizado 1µg de cada um dos *pools* para as diferentes reações.

Após a fase de digestão enzimática, adicionou-se *SYBR Green qPCR Master Mix* e o conteúdo foi adicionado a uma placa de PCR (*polymerase chain reaction*) *array* de 96 poços contendo primers pré-aliquoteados que flanqueiam as regiões promotoras de interesse (Figura.03). A reação de real-time PCR foi realizado no *StepOne Plus Real-Time PCR System* (*Thermo Fisher Scientific*, DE, USA) programado de acordo com instruções do fabricante seguindo as condições de ciclagem estabelecidas.

Os níveis de metilação foram determinados utilizando o software de análise de dados *EpiTectMethyl II DNA PCR 96-Well Data Analysis spreadsheet* (*Life Technologies*, Carlsbad, CA). Os dados são copiados e transferidos para uma template no *Microsoft Excel* disponível gratuitamente para download no site do fabricante. Os resultados são apresentados em porcentagens de DNA metilado e DNA não metilado a partir dos valores obtidos de *cycle threshold* (Ct) (Figura.03).

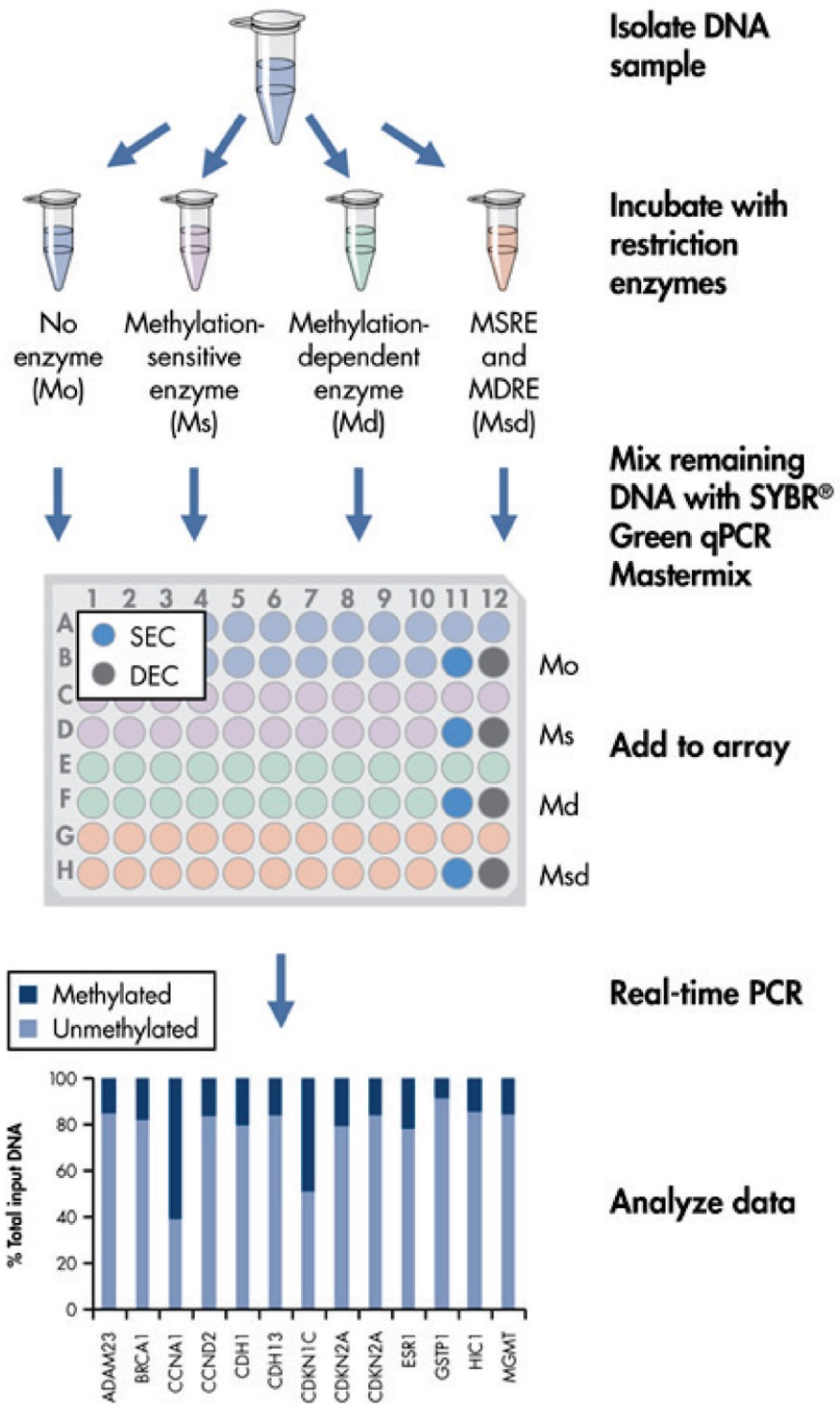


Figura 03: Procedimentos *EpiTect*® *Methyl II Signature Human Cytokine Production PCR Array*  
 Fonte: Adaptado de *EpiTect*® *Methyl II PCR Array Handbook*

## 4. Artigos Científicos

## 4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

### 4.1 Artigo 01 - Dental Traumatology [ISSN 1600-4469]

#### **INTERACTION OF DEMOGRAPHIC AND CLINICAL FACTORS ON PERIODONTAL HEALING OF REPLANTED PERMANENT TEETH: A CROSS-SECTIONAL CLINICAL STUDY**

Dental Traumatology - Proof for Peer Review

# Dental Traumatology

#### **INTERACTION OF DEMOGRAPHIC AND CLINICAL FACTORS ON PERIODONTAL HEALING OF REPLANTED PERMANENT TEETH: A RETROSPECTIVY STUDY**

|                  |   |
|------------------|---|
| Journal:         | <i>Dental Traumatology</i>  |
| Manuscript ID    | DT-11-19-OA-4338  |
| Manuscript Type: | Original Article  |
| Topic:           | Endodontics and Periodontal Aspects                                     |
| Keywords:        | Avulsion, Inflammatory root resorption, Tooth replantation, Interaction |
|                  |   |

SCHOLARONE™  
Manuscripts

Dental Traumatology

## ABSTRACT

**Background/Aims:** Inflammatory external root resorption is a serious outcome following traumatic dental injuries resulting from damage to periodontal ligament and cementum together with the infection of root canal. The present study aimed to explore prognostic factors, as well as their interactions, for the development of severe cases of IERR in permanent teeth replanted after avulsion.

**Methods:** Records from 427 patients with 581 replanted permanent mature teeth treated at the Dental trauma Clinic of the Federal University of Minas Gerais, from 1994 to 2018, were reviewed. IERR presence and extension was assessed at the visit of pulpectomy adopting the Andersson's radiographical index of root resorption. An ordinal multinomial regression model was used to test the effect of patient's age at trauma, type of teeth, presence of concomitant fractures, storage conditions, length of extra-alveolar period of the avulsed tooth, SAT use, time of pulpectomy and splinting timing in relation to severity of IERR.

**Results:** Radiographic signs of IERR were found in 469 teeth (80.7%), most of them classified as mild (63.4%) The multivariate model showed that patients' age (OR 0.909, CI 95% 0.875 – 0.945,  $p < 0.001$ ) and time elapsed between replantation and pulpectomy (OR 2.201, CI 95% 1.87-2.60,  $p < 0.001$ ) were significantly associated to IERR severity. In addition, it was demonstrated that the effect of the delay in pulpectomy diminished with the increase in patients' age evidencing a quantitative interaction (OR -0.035, CI 95% -0.060 - -0.010,  $p = 0.006$ ).

**Conclusion:** The present results demonstrated that delayed pulpectomy increased the risk of severe IERR in an age-dependent way, since the magnitude of such effect diminish according to an increase in the patients' age at the moment of trauma. This result represent an contribution for treatment decision-making and highlight the need for target strategies to coordinate emergency and long-term care in dental traumatology.

**KEYWORDS:** Tooth avulsion, tooth replantation, external inflammatory root resorption, interaction

## INTRODUCTION

Progressive inflammatory external root resorption (ERR) is a serious complication of periodontal healing in traumatized teeth, resulting from both loss of protective layers of external root surface due to damage to periodontal fibers and cementum, and the presence

of intracanal infection<sup>1,2</sup>. Immediately after replantation, an immune-inflammatory process is initiated enrolling the colonization of denuded root surfaces by clastic cells originating from adjacent bone. If the vitality of the periodontal membrane has been at least partially preserved, repair can occur with the apposition of newly formed periodontal fibers and reparative cementum within the resorptive lacunae<sup>3</sup>. Nonetheless, the course of such a response may be changed when bacteria and their toxic products, present inside the root canal, reach the damaged external root surface through exposed dentinal tubules. There, they continuously stimulate osteoclastic activity switching the initial healing process into a catalytic progressive inflammatory external root resorption (IERR). The resorptive process will progress for as long as bacteria remain inside the root canal and may cause rapid destruction of the dental root, unless the intracanal infection is eliminated<sup>1,2,4,5</sup>. The role of pulp canal infection supporting IERR has been demonstrated experimentally<sup>6-10</sup> and confirmed clinically through the association between the timing of pulpectomy after replantation and the development of IERR<sup>11-16</sup>. The patient's age at the time of trauma has also been described as an important variable in the progression and severity of IERR. It is well-established that the younger the patient, the greater the resorption rate<sup>16-18</sup>. Likewise, earlier stages of root development have also been related to the rapid progression of IERR<sup>17,19,20</sup>. Moreover, increased extra-alveolar time in unsuitable storage conditions<sup>12,18,21</sup>, the presence of visible root contamination, and additional crown fracture have also been associated with IERR after replantation<sup>22</sup>. In spite of the relevance of the above-mentioned factors in triggering IERR, the clinical literature on dental trauma is still scant regarding the modulation of IERR; and, these factors cannot completely explain interindividual differences observed clinically.

Therefore, the present study aimed to explore prognostic factors for the development and extension of IERR, as well as their interactions in permanent teeth replanted after avulsion. Identifying prognostic and/or predictive factors in clinical research is particularly important because they can support specific target therapeutic strategies.

## **MATERIALS AND METHODS**

The present study retrospectively evaluated IERR activity in replanted permanent mature teeth, from patients treated at the Federal University of Minas Gerais (*Universidade Federal de Minas Gerais*, UFMG) in Belo Horizonte, Brazil, from 1994 to 2018. Patients received initial care at the Dental emergency service at the Metropolitan Hospital of Belo Horizonte

and, after that, were referred to proceed with treatment and follow-up at the Dental Trauma Clinic at the School of Dentistry of UFMG (DTC-SD-UFMG). Replantation was accomplished after irrigating the alveolus abundantly with saline. The avulsed tooth was held by the crown and gently inserted back into the socket under light digital pressure on the buccal and palatal sides of the alveolar process. The position of the replanted tooth was verified radiographically and then an orthodontic wire ( $\varnothing$  0.8 mm) splint was fixed with composite resin. No root surface treatment was performed. Systemic antibiotic therapy (SAT) prescription was not mandatory. Immobilization removal and pulpectomy were performed at the first visit to the DTC-SD-UFMG. For the purpose of the present study, patients' records were reviewed in order to collect clinical data regarding patients' age at the time of trauma, extra-alveolar period and storage conditions of the avulsed teeth, splinting and pulpectomy timing, and the use of SAT. Radiographies taken at the replantation visit were used to determine stage of root development, and only teeth with complete root development and closed apical foramen were included in this sample. Teeth with additional traumatic injuries such as root, crown-root and bone fractures, and those with extensive restorations, history of endodontic treatment or radiographic signs of root resorption prior to the injury were excluded. This study was approved by the Committee on Ethics in Research of the Federal University of Minas Gerais (UFMG) (CAAE 11883119.9.0000.5149).

### **Radiographic Assessment of Root Resorption**

Periapical radiographs were taken following criteria previously described<sup>16</sup> and were independently and blindly analyzed by two qualified investigators (JVB and DABF), under optimal conditions<sup>16</sup>. IERR was diagnosed radiographically when bowl-shaped radiolucencies were seen in the resorption cavities and adjacent bone<sup>20</sup>. IERR extension was assessed using the resorption index developed by Andersson *et al.*<sup>17</sup>.

### **Statistical Analysis**

An ordinal, multinomial regression model was used to test the association between the patient's age at trauma, type of teeth, presence of concomitant fractures, storage conditions and length of extra-alveolar period of the avulsed tooth, SAT use, and the pulpectomy and splinting timing in relation to presence of IERR at the pulpectomy visit. For this purpose, indices were grouped into four categories, as follows: Absent (index=0), Mild (indices from 1 to 4), Moderate (indices from 5 to 8) and Severe (indices from 9 to 12). For each explanatory variable a univariate regression model was adjusted, and those with p-values < 0.25

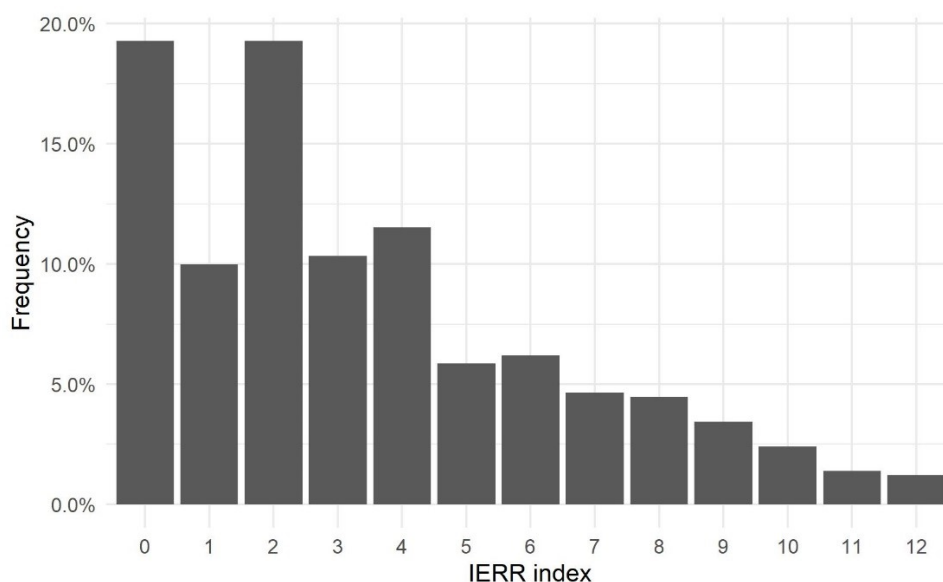
proceeded to the multivariate analysis. Interaction between covariates was also assessed, including a multiplicative interaction term for those variables that were significant in the multivariate model. The generalized estimation equation (GEE) method was used, considering the potential correlation in cases in which more than one tooth was replanted in the same patient. Since there were missing data for the SAT prescription, multiple imputation was used via the Multiple Imputation by Chained Equations (MICE) package in R, so that individuals with missing information could be included in the analysis<sup>23</sup>. The Kappa statistic was used to estimate inter- and intra-rater agreement values for the assessment of ERR indexes and indicated excellent intra-examiner agreement for both examiners (0.85% and 0.82%) and fair to good inter-examiner agreement (0.75%). Statistical analysis was performed using the R language and environment (R Core Team, Version 3.5.3, 2018, Vienna, Austria). The level of significance was set at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

Records of a total of 1288 avulsed and replanted teeth from 871 patients were reviewed. A final sample of 427 patients with 581 replanted permanent, mature teeth was achieved after applying the exclusion criteria. Sample distribution according to gender was 295 males (69.1%) and 132 females (30.9%), and the patients' median age at trauma was of 12.6 (range from 6.6 to 48.7). The upper central incisors were the most affected teeth (75.7%), followed by the upper lateral incisors (15.1%). The lower incisors represented 6.5% and the canines 2.6% of the cases. Concomitant uncomplicated crown fractures were present in 33.9% of the avulsed teeth. The median extra-alveolar period was 120 min (range from 5 min to 7 days). Most of the teeth were stored in a dry environment (39.5%), followed by storage in milk (22.7%), saline (20.6%), water (14.3%) and saliva (2.8%). Teeth that were kept dry for more than 20 min prior to storage in a wet medium were classified in the dry environment group. Systemic therapy with amoxicillin was prescribed for 80 patients (36.2%). Time elapsed between replantation and the onset of endodontic therapy ranged from 15 days to 6.5 years, with a median time of 2.3 months. Splinting time ranged from 15 days to 2.9 years, with a median period of 42 days.

Radiographic signs of IERR were found in 469 teeth (80.7%). Sample distribution according to indexes of IERR is presented in **Figure.01**. Most of the cases were classified as mild (63.4%). Moderate IERR was diagnosed in 26.2% of the teeth, and severe in 10.5%. Results

of the univariate analysis are presented in **Table.01**. They demonstrate that the increase in the patients' age at the moment of trauma was nominally associated with less probability of replanted teeth having moderate or severe IERR by the time of late pulpectomy. On the other hand, the increase in the time until pulpectomy and splinting timing were nominally associated with greater probability of higher indices of IERR at the onset of endodontic therapy. These covariates were tested in a multivariate model together with the presence of concomitant uncomplicated crown fractures in the avulsed tooth, teeth group and storage conditions since they presented p values lower than 0.25. The final multivariate model demonstrated that only the patients' age at the moment of trauma and the time elapsed between replantation and pulpectomy remained significant, as well as their interaction term (**Table.02**). It can be seen in **Figure.02** that the effect of time until pulpectomy was attenuated by the increase in patients 'age at the moment of trauma. Considering that the interaction term was significant, the main effect of these covariates should no longer be considered isolated, but must be interpreted by setting values for one of them and vice versa. For example, in patients who were 9 years old at the moment of trauma, the effect of an increase in the time elapsed until pulpectomy from 10 days to 20 days enhanced the odds of severe or moderate IERR, compared to mild or absent IERR, by 166% (CI 125% to 214%). For patients who were 16 years old at the moment of trauma, such an increase was 124%.



**FIGURE 1:** Sample distribution according to indexes of IERR at the time of pulpectomy

**TABLE 1: Univariate and Multiple Multinomial Regression Model – Association of potential risk factors and severe IERR**

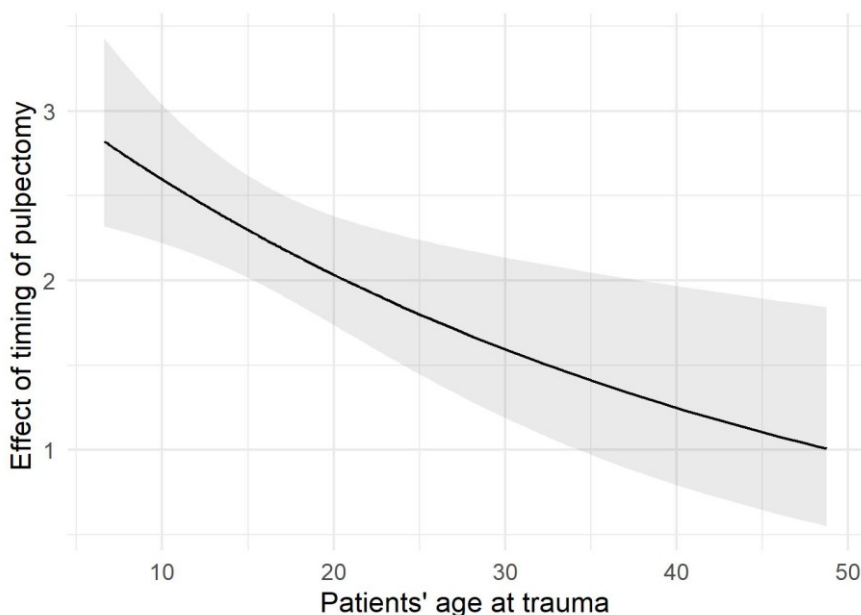
|                                    | <u>No IERR + Mild IERR X Moderate + Severe IERR</u> |   |
|------------------------------------|---|---|
|                                    | <u>OR (CI 95%) p</u>                                |   |
| <b>Patients' age at trauma</b>     |   |   |
| Years                              | <b>0.927 (0.899 – 0.955) p &lt; 0.001</b>           | <b>0.909 (0.875 – 0.945) p &lt; 0.001</b> |
| <b>Storage Condition</b>           |   |   |
| Dry                                | Reference   |   |
| Water,                             | <b>1.413 (0.881 – 2.276) p = 0.152</b>              |   |
| Saline,                            | 1.088 (0.685 – 1.726) p = 0.722                     |   |
| Saliva                             | 0.851 (0.302 – 2.403) p = 0.761                     |   |
| Milk                               | 1.061 (0.643 – 1.749) p = 0.818                     |   |
| <b>Extra-alveolar period*</b>      |   |   |
| Minutes                            | 1.008 (0.984 – 1.033) p = 0.501                     |   |
| <b>Timing of pulpectomy*</b>       |   |   |
| Days after replantation            | <b>2.148 (1.840 – 2.508) p &lt; 0.001</b>           | <b>2.201 (1.866 – 2.596) p &lt; 0.001</b> |
| <b>Systemic Antibiotic Therapy</b> |   |   |
| No                                 | Reference   |   |
| Yes                                | 1.192 (0.767 – 1.859) p = 0.436                     |   |
| <b>Splinting time*</b>             |   |   |
| Days after replantation            | <b>1.364 (1.209 – 1.538) p &lt; 0.001</b>           |   |
| <b>Concomitant Crown Fractures</b> |   |   |
| No                                 | Reference   |   |
| Yes                                | <b>1.248 (0.916 - 1.704) p = 0.160</b>              |   |
| <b>Teeth group</b>                 |   |   |
| Central Upper incisors             | Reference   |   |
| Lateral Upper incisors             | <b>1.312 (0.868 – 1.983) p = 0.197</b>              |   |
| Mandibular incisors                | 1.132 (0.206 – 6.219) p = 0.887                     |   |

\* Log transformed

**TABLE 2: Final multivariate Multinomial Regression Model – Effect of patients'age at trauma, timing of pulpectomy and their interaction in the odds of developing Severe IERR**

|   | <u>No IERR + Mild IERR X Moderate + Severe IERR</u> |                  |
|---|---|------------------|
|   | <u><math>\beta</math> (CI 95%) p</u>                |                  |
| <b>Patients' age at trauma</b>                        |   |                  |
| Years   | 0.051 (-0.603 – 0.163)                              | 0.367            |
| <b>Timing of pulpectomy*</b>                          |   |                  |
| Days after replantation                               | 1.729 (1.308 - 2.149)                               | p < 0.001        |
| <b>Patients' age at trauma X Timing of Pulpectomy</b> |   |                  |
|   | <b>-0.035 (-0.060 - -0.010)</b>                     | <b>p = 0.006</b> |

\* Log transformed



**FIGURE 2:** Interaction between patients' age at trauma and late pulpectomy.

Y axis indicates the OR of having severe or moderate IERR with the increase of timing of pulpectomy. X axis indicates the patients' age at the moment of trauma. The odds ratio of having severe or moderate IERR decreases with increase in patients' age at the trauma.

## DISCUSSION

The present study evaluated IERR activity in 581 permanent mature teeth replanted after avulsion, as well as the prognostic value of base line variables such as patients 'age at the moment of trauma, concomitant crown fractures, extra-alveolar period and storage conditions of the avulsed tooth, together with treatment related variables like SAT prescription and timing of pulpectomy and immobilization. Assuming that IERR is a multifactorial event, possible prognostic/predictive factors, ideally, should not only be tested nominally for their association with IERR, through a univariate analysis, but should also be tested simultaneously by performing a multiple analysis. In addition, variables that remain significant in the multivariate model should be tested for associations between them, i.e., for their interaction<sup>24</sup>. This procedure was adopted for the present sample and allowed the investigation of whether the effect of one factor varies according to the levels of another determining factor. This could be expected, for example, for the extra-alveolar period and storage conditions; or, for the timing of pulpectomy and patients 'age at the moment of trauma. Identifying whether a baseline factor is prognostic and/or predictive can be done either prospectively, by incorporating factors that may influence outcomes into the sampling planning for a randomized clinical trial (RCT), or retrospectively, using exploratory analyses to test a pre-settled hypothesis built

over an underlying biologic plausibility or based in previous reports<sup>24</sup>. Although ideal, conducting RCTs to investigate treatment procedures associated with the acute phase of dental trauma has ethical and methodological limitations that make them almost always impractical. Therefore, retrospective longitudinal studies are an important source of robust evidence since they fulfill the necessary prerequisites regarding sample size and standardization and receive appropriate statistical treatment<sup>25</sup>. Such conditions were met in the present study.

The current results demonstrated that increasing the time until pulpectomy enhances the likelihood of having advanced stages of IERR. These findings corroborate previous clinical observations that delayed pulp extirpation is associated with greater risk and severity of IERR<sup>11-16</sup>. Taken together, these results are also consistent with experimental studies demonstrating that infection present inside the root canal represents the main risk factor for the onset of IERR<sup>6-10</sup>. It was also observed in the present study that patients' age at the time of trauma was inversely associated with the incidence and extent of IERR. This effect has also been observed in previous clinical studies and can be explained by the wider diameter of dentinal tubules in young mature teeth that facilitates the passage of bacteria and/or their endotoxins from the root canal system to the external root surface where they amplify and maintain the resorptive process<sup>16,18,20,26</sup>.

However, the significant association between these two covariates observed in the present study makes an important and original contribution by showing that patients' age at the moment of trauma was not only a relevant prognostic factor for IERR activity, but also an important predictive factor for the effect of the timing of the onset of endodontic therapy. Provided that the magnitude of the effect of late pulpectomy diminished according to an increase in the patients' age, but maintained the same direction, a quantitative interaction was evidenced. In other words, the delay in the onset of endodontic therapy affected IERR in an age-dependent way.

This result is critically important to support treatment decision-making, not only at an individual level but especially for organizing emergency and long-term care for patients with TDI. Providing emergency services for TDI still represents a challenge in many places in the world, and this matter has been addressed in some editorials by<sup>27-29</sup> and explored in a preliminary, observational study by Alnaggar & Andersson<sup>30</sup>. The authors concluded that the major problem was limited availability and competence, especially outside office working

hours when most TDIs occur. It was also emphasized that further professional education for general dentists is needed, as well as the availability of specialists prepared to deal with more complex injuries. Taking into account that TDI is still a neglected, albeit a very frequent, oral condition worldwide<sup>31</sup>, there is also an urgent need for public policies that guaranty the organization of adequate first aid and emergency services.

Currently, it is recommended that pulpectomy be performed from 7 to 10 days after replantation<sup>32</sup>, or even immediately, as part of the emergency management of teeth in which revascularization is not expected<sup>2</sup>. While there is no doubt that such recommendations are biologically justified, one can question how to achieve such a goal when confronted with the challenges for providing adequate treatment for patients with TDI. In the present study, the initial treatment was performed at the Dental emergency service of the Metropolitan Hospital in Belo Horizonte and, afterward, patients were referred to the Dental Trauma Clinic of the School of Dentistry at UFMG (DTC-SD-UFMG) to proceed with treatment and follow-up. These two institutions integrate the UFMG multidisciplinary Dental Trauma Program and, since 1994, have been working together to treat traumatized patients in Belo Horizonte<sup>33</sup>. This might explain why the median period of 2.3 months for pulpectomy, observed in the present sample, is higher than what is recommended. This, in turn, may explain the greater incidence of IERR observed in the present sample (80.7% of teeth). Most of them were classified as mild, with indices ranging from 1 to 4. This is a negative scenario when compared to previous clinical reports regarding the prevalence of ERR<sup>34</sup>. However, these numbers communicate the real limitations, rather than negligence, that are encountered in the coordination and implementation of networks to link practitioners and patients, at various sites and organizations<sup>35</sup>. In this context, the present results make an important contribution since they support a range of approaches and interventions to optimize resources and guaranty the continuity of care for young, injured children that are at greater risk of complications.

The viability of the periodontal membrane and the integrity of the cementum have been shown to be the most important prognostic factors for healing, following replantation of traumatically avulsed teeth. Loss of these protective layers, caused by mechanical damage during tooth displacement or resulting from unsuitable and prolonged extra-alveolar storage conditions, is a *sine qua non* condition for triggering any type of ERR after a TDI. Therefore, development of IERR soon after replantation also has been associated with extra-alveolar period and storage conditions<sup>12,21,22</sup>. Surprisingly, these factors did not affect IERR activity in the present

sample. Considering that periodontal healing can be complicated by infection emanating from an infected canal, despite initially favorable periodontal conditions<sup>36</sup>, the delayed pulpectomy observed in the present sample may explain such a finding since the prolonged exposure of the damaged PL to bacteria and their byproducts might have overwhelmed the favorable extra-alveolar period and storage conditions.

SAT prescription did not affect IERR activity in the present sample. This is in line with previous clinical reports showing that the benefits of SAT at the time of replantation was inconclusive<sup>16,26,37-41</sup>. However, such clinical results should be taken with caution since they diverge or lack important details such as the type, dosage and duration of antibiotics prescribed. In addition, no studies have assessed patient compliance with the treatment. On the other hand, extrapolation to humans, of *in vivo* experimental results showing that SAT prevented IERR<sup>8,42,43</sup>, has well-known limitations. This is an important issue, and professionals should balance the need to optimize the chances for the replantation to succeed against the current trend to use antibiotics only if there is definite advantage to the patient. Therefore, there is a clear need for further research in this area.

Splinting time has been related to PDL healing in experimental studies<sup>44-46</sup>, but no relationship between immobilization and IERR could be demonstrated either in the present study or in previous ones<sup>12,16</sup>. The significant association observed in the univariate analysis can be explained by the fact that splinting and pulpectomy timing are closely correlated in the present sample. Concomitant crown fractures in the avulsed teeth also have not influenced IERR in the present sample, which contradicts results from a single, previous, human study that demonstrated an increased risk of root resorption in the presence of additional damage to the dental crown<sup>22</sup>.

## **CONCLUSION**

The present results showed a pivotal role of endodontic infection in the development of IERR in replanted permanent teeth. In addition, it was demonstrated that delayed pulpectomy increased the odds of replanted permanent teeth having moderate and severe IERR in an age-dependent way. The need for target strategies to guaranty continuity of care for young children, that are at greater risk of complications, was highlighted.

## REFERENCES

1. Trope M. Avulsion of permanent teeth: theory to practice. *Dent Traumatol.* 2011;27(4):281-94.
2. Abbott PV. Prevention and management of external inflammatory resorption following trauma to teeth. *Aust Dent J.* 2016;61:82-94.
3. Hammarström L, Blomlöf L, Lindskog S. Dynamics of dentoalveolar ankylosis and associated root resorption. *Endod Dent Traumatol.* 1989;5(4):163-75.
4. Hammarstrom L, Pierce A, Blomlof L, Feiglin B, Lindskog S. Tooth avulsion and replantation-a review. *Endod Dent Traumatol.* 1986;2(1):1-8.
5. Andreasen J, Andreasen F. Root resorption following traumatic dental injuries. *Proceedings of the Finnish Dental Society. Suomen Hammaslaakariseuran toimituksia.* 1992;88:95-114.
6. Andreasen JO. The effect of pulp extirpation or root canal treatment on periodontal healing after replantation of permanent incisors in monkeys. *J Endod.* 1981;7(6):245-52.
7. Andreasen JO. Relationship between surface and inflammatory resorption and changes in the pulp after replantation of permanent incisors in monkeys. *J Endod.* 1981;7(7):294-301.
8. Hammarstrom L, Blomlof L, Feiglin B, Andersson L, Lindskog S. Replantation of teeth and antibiotic treatment. *Endod Dent Traumatol.* 1986;2(2):51-7.
9. Trope M, Yesilsoy C, Koren L, Moshonov J, Friedman S. Effect of different endodontic treatment protocols on periodontal repair and root resorption of replanted dog teeth. *J Endod.* 1992;18(10):492-96.

10. Nishioka M, Shiiya T, Ueno K, Suda H. Tooth replantation in germ-free and conventional rats. *Dent Traumatol*. 1998;14(4):163-73.
11. Coccia CT. A clinical investigation of root resorption rates in reimplanted young permanent incisors: a five-year study. *J Endod*. 1980;6(1):413-20.
12. Kinirons MJ, Boyd DH, Gregg TA. Inflammatory and replacement resorption in reimplanted permanent incisor teeth: a study of the characteristics of 84 teeth. *Endod Dent Traumatol*. 1999;15(6):269-72.
13. Stewart CJ, Elledge RO, Kinirons MJ, Welbury RR. Factors affecting the timing of pulp extirpation in a sample of 66 replanted avulsed teeth in children and adolescents. *Dent Traumatol*. 2008;24(6):625-7.
14. Hinckfuss SE, Messer LB. An evidence-based assessment of the clinical guidelines for replanted avulsed teeth. Part I: Timing of pulp extirpation. *Dent Traumatol*. 2009;25(1):32-42.
15. Werder P, von Arx T, Chappuis V. Treatment outcome of 42 replanted permanent incisors with a median follow-up of 2.8 years. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*. 2011;121(4):312-20.
16. Bastos JV, Ilma de Souza Côrtes M, Andrade Goulart EM, Colosimo EA, Gomez RS, Dutra WO. Age and timing of pulp extirpation as major factors associated with inflammatory root resorption in replanted permanent teeth. *J Endod*. 2014;40(3):366-71.
17. Andersson L, Bodin I, Sorensen S. Progression of root resorption following replantation of human teeth after extended extraoral storage. *Endod Dent Traumatol*. 1989;5(1):38-47.
18. Petrovic B, Markovic D, Peric T, Blagojevic D. Factors related to treatment and outcomes of avulsed teeth. *Dent Traumatol*. 2010;26(1):52-9.

19. Kristerson L, Andreasen JO. Influence of root development on periodontal and pulpal healing after replantation of incisors in monkeys. *Int J Oral Surg*. 1984;13(4):313-23.
20. Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 1. Diagnosis of healing complications. *Endod Dent Traumatol*. 1995;11(2):51-8.
21. Boyd DH, Kinirons MJ, Gregg TA. A prospective study of factors affecting survival of replanted permanent incisors in children. *Int J Paediatr Dent*. 2000;10(3):200-5.
22. Donaldson M, Kinirons MJ. Factors affecting the time of onset of resorption in avulsed and replanted incisor teeth in children. *Dent Traumatol*. 2001;17(5):205-9.
23. Azur MJ, Stuart EA, Frangakis C, Leaf PJ. Multiple imputation by chained equations: what is it and how does it work? *Int J Meth Psych Res*. 2011;20(1):40-9.
24. Simms L, Barraclough H, Govindan R. Biostatistics primer: what a clinician ought to know--prognostic and predictive factors. *J Thorac Oncol*. 2013;8(6):808-13.
25. Andersson L, Andreasen JO. Important considerations for designing and reporting epidemiologic and clinical studies in dental traumatology. *Dent Traumatol*. 2011;27(4):269-74.
26. Andreasen JO, Hjørting-Hansen E. Replantation of teeth. I. Radiographic and clinical study of 110 human teeth replanted after accidental loss. *Acta Odontol Scand*. 1966;24(3):263-86.
27. Andersson L. How is dental trauma emergency care organized in your country? *Dent Traumatol*. 2009;25(6):555.
28. Andersson L. Availability of emergency dental treatment-a question of organization. *Dent Traumatol*. 2010;26(3):2011 .

29. Andersson L. Our duty to promote local emergency services for traumatic dental injuries. *Contemp Clin Dent*. 2015;6(5):1-2.
30. Alnaggar D, Andersson L. Emergency management of traumatic dental injuries in 42 countries. *Dent Traumatol*. 2015;31(2):89-96.
31. Petti S, Glendor U, Andersson L. World traumatic dental injury prevalence and incidence, a meta-analysis-One billion living people have had traumatic dental injuries. *Dent Traumatol*. 2018;34(2):71-86.
32. Andersson L, Andreasen JO, Day P, et al. International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2. Avulsion of permanent teeth. *Dent Traumatol*. 2012;28(2):88-96.
33. Bastos JV, Côrtes MIdS. Traumatismo dentário. *Arquivos em Odontologia*. 2011;47:80-5.
34. Souza BDM, Dutra KL, Kuntze MM, et al. Incidence of Root Resorption after the Replantation of Avulsed Teeth: A Meta-analysis. *J Endod*. 2018;44(8):1216-27
35. World Health Organization. Continuity and coordination of care: a practice brief to support implementation of the WHO Framework on integrated people-centred health services. 2018.
36. Blomlöf L, Lindskog S, Hammarström L. Influence of pulpal treatments on cell and tissue reactions in the marginal periodontium. *J Periodontol*. 1988;59(9):577-83.
37. Andersson L, Bodin I. Avulsed human teeth replanted within 15 minutes-a long-term clinical follow-up study. *Endod Dent Traumatol*. 1990;6(1):37-42.
38. Crona-Larsson G, Bjarnason S, Norén JG. Effect of luxation injuries on permanent teeth. *Dent Traumatol*. 1991;7(5):199-206.

39. Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 4. Factors related to periodontal ligament healing. *Endod Dent Traumatol.* 1995;11(2):76-89.
40. Sae-Lim V, Yuen KW. An evaluation of after-office-hour dental trauma in Singapore. *Dent Traumatol.* 1997;13(4):164-70.
41. Hinckfuss SE, Messer LB. An evidence-based assessment of the clinical guidelines for replanted avulsed teeth. Part II: prescription of systemic antibiotics. *Dent Traumatol.* 2009;25(2):158-64.
42. Sae-Lim V, Wang CY, Trope M. Effect of systemic tetracycline and amoxicillin on inflammatory root resorption of replanted dogs' teeth. *Endod Dent Traumatol.* 1998;14(5):216-20.
43. Sae-Lim V, Wang CY, Choi GW, Trope M. The effect of systemic tetracycline on resorption of dried replanted dogs' teeth. *Endod Dent Traumatol.* 1998;14(3):127-32.
44. Andreasen JO. The effect of splinting upon periodontal healing after replantation of permanent incisors in monkeys. *Acta Odontol Scand.* 1975;33(6):313-23.
45. Nasjleti CE, Castelli WA, Caffesse RG. The effects of different splinting times on replantation of teeth in monkeys. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1982;53(6):557-66.
46. Andersson L, Lindskog S, Blomlöf L, Hedström KG, Hammarström L. Effect of masticatory stimulation on dentoalveolar ankylosis after experimental tooth replantation. *Dent Traumatol.* 1985;1(1):13-6.

## 4.2 Artigo 02 - Brazilian Oral Research [ISSN 1806-8324]

**DNA METHYLATION PATTERNS OF IMMUNE RELATED GENES RESPONSE  
IN INFLAMMATORY EXTERNAL ROOT RESORPTION**

Brazilian Oral Research



**DNA METHYLATION PATTERNS OF IMMUNE RELATED GENES  
RESPONSE IN INFLAMMATORY EXTERNAL ROOT  
RESORPTION**

|  |  |
|--|--|
| Journal:   | <i>Brazilian Oral Research</i>                       |
| Manuscript ID  | Draft  |
| Manuscript Type:   | Original Research Report                             |
| Specialties:   | Oral Pathology                                       |
| Category--Select your categories from the <A HREF='http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html' target='_new'><b> MeSH</b></a> or <A HREF='http://decs.bvs.br/' target='_new'><b> DeCS</b></a> lists.: | Tooth replantation, Root resorption, DNA methylation |
|  |  |

SCHOLARONE™  
Manuscripts

<https://mc04.manuscriptcentral.com/bor-scielo>

## ABSTRACT

Inflammatory external root resorption (IERR) is a pathological process defined as the progressive loss of dental hard tissue, dentine and cementum, resulting from the combination of loss of external root protective apparatus and root canal infection. It has been suggested that healing patterns after tooth replantation may be influenced by the genetic and immunological profiles of the patients. The purpose of the present investigation was to evaluate the DNA methylation patterns of 22 immune response related genes in extracted human teeth presenting IERR. Methylation assays were performed on samples of root fragments showing IERR, and compared with healthy bone tissue collected during the surgical extraction of impacted teeth. The methylation patterns were quantified using EpiTect Methyl II Signature Human Cytokine Production PCR Array. Results revealed a higher hypermethylation of the *FOXP3* gene promoter in IERR (65.95%) compared to the bone group (23.43%). Our study suggests that the differential methylation patterns of *FOXP3* may be involved in IERR modulation, and this could be related to the presence of root canal infection.

## KEY WORDS

Dental trauma, inflammatory external root resorption, DNA methylation, FOXP3

## INTRODUCTION

Inflammatory external root resorption (IERR) is a pathological process defined as the progressive loss of dental hard tissue, dentine and cementum, resulting from the combination of loss of external root protective apparatus and root canal infection<sup>1,2</sup>. Traumatic luxation injuries are a frequent cause of IERR, due to damage to the periodontal ligament (PDL) and cementum. The denuded root surface allows pre-osteoclasts to attach and become activated starting the resorption process<sup>3,4</sup>. However, persistent stimulation is essential before resorption can proceed. Progressive IERR is sustained by infection originating from the root canal that reaches the external root surface in resorbed areas via exposed dentinal tubules. Once bacteria and their byproducts arrive at the PDL space, they switch the ongoing healing process to an immune-inflammatory response<sup>1,5</sup>.

The molecular and cellular events involved in IERR are believed to be similar to those of bone resorption. These events are also modulated by soluble factors of the immune response which, in turn, is regulated by gene expression profiling <sup>6,7</sup>. Epigenetics is probably the most significant interface between genetic and environmental factors, giving rise to the phenotype, and may interfere with the interindividual variability of the immune response and susceptibility to diseases <sup>8</sup>. The epigenetic mechanisms are flexible genomic parameters that can alter cell behavior by controlling gene expression patterns during the cell cycle, development or differentiation without altering the DNA sequence <sup>9</sup>. DNA methylation is one of the best-studied and critically important epigenomic modifications <sup>10</sup>. It is a covalent modification that occurs by the addition of a methyl (CH<sub>3</sub>) group at the 5' cytosine in the sequence context of Cytosine-phosphate-Guanine (CpG) dinucleotides. The addition of a methyl group at the CpG islands, which are mostly located in the promoter regions of genes, results in stable silencing of gene expression <sup>11</sup>. In some circumstances, bacterial challenge and inflammation can induce changes in epigenetic patterns and, consequently, gene expression. Current research has demonstrated the involvement of specific DNA methylation in the pathogenesis of a variety of different oral inflammatory diseases such as periodontitis <sup>8,12</sup> and periapical lesions due to pulpal infection <sup>13-16</sup>. Such results make it reasonable to assume that these mechanisms may also affect IERR activity. In addition, it has been suggested that the genetic and immunological profiles of patients influence healing patterns after tooth replantation, regardless of the management of the avulsed tooth <sup>17</sup>.

Therefore, the present study aimed to identify methylation patterns in the immune related genes of patients with IERR. We hypothesize that the epigenetic status of immune response-related genes may harbor different putative methylation sites, which can contribute to the dynamics of IERR development.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Subjects and sample collection**

This study was approved by the Committee on Ethics in Research of the Federal University of Minas Gerais, FUMG (CAAE 11883119.9.0000.5149). All participants gave their written consent to participate.

The case group comprised 8 replanted permanent teeth referred for extraction, presenting radiographic signs of IERR according to Andreasen's criteria <sup>18</sup>: bowl-shaped radiolucencies at both the root surface and the adjacent bone. Radiographies were standardized according to previously described criteria <sup>19</sup>, and were examined independently by two investigators (DABF and JVB). The control group comprised 6 samples of healthy bone from patients who required extraction of their third molars. Samples of root fragments presenting IERR and of healthy bone tissue were obtained during the surgical procedure, and were immediately stored at -80°C for later DNA extraction. Patients with systemic conditions requiring the use of bone metabolism modifiers and patients with periodontal disease or radiographic evidence of periodontal bone loss were excluded.

### **DNA methylation analysis**

Samples of teeth and bone fragments were grinded in a tube containing 2.3 mm chrome-steel beads (Biospec, cat. nº. 11079123c) using a shaker equivalent to a MiniBeadbeater. Genomic DNA (gDNA) was isolated using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. The DNA concentration and purity were measured by spectrophotometry, using NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

The resultant gDNA extracts were gathered to form the case and control groups. All patients contributed the same amount of DNA to the pools. After preparation of the pools, the samples were digested for DNA methylation analysis using the EpiTectMethyl DNA Restriction Kit (Qiagen, Inc). The method is based on detecting quantitative DNA after cleavage using four enzyme reactions (without enzymes, methylation-sensitive restriction enzyme, methylation-dependent restriction enzyme, and both enzymes). The methylation-sensitive restriction enzyme and the methylation-dependent restriction enzyme digest unmethylated and methylated DNA, respectively. According to the manufacturer's protocol, 1 µg of each pool was used for each digestion reactions.

Following the enzymatic digestion phase, analysis of the methylation status of 22 immune response–related genes was performed using EpiTect Methyl II Signature Human Cytokine Production PCR Array (SABiosciences, Qiagen, Valencia, CA, cat. n°.335212 EAHS-541ZE). For this analysis, SYBR Green qPCR Master Mix was added to a 96-well PCR array plate containing the 22 primers of promoter genes (**Table 1**). Real-time PCR reaction was carried out using the StepOne Plus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, DE, USA), programmed according to manufacturer's instructions, following established cycling conditions. Each array includes specific control assays to monitor the cutting efficiencies of methylation-sensitive and methylation-dependent enzymes and to ensure reliable results.

**TABLE 1.** Composition of EpiTect Methyl II Signature Human Cytokine Production PCR Array (SABiosciences, Qiagen)

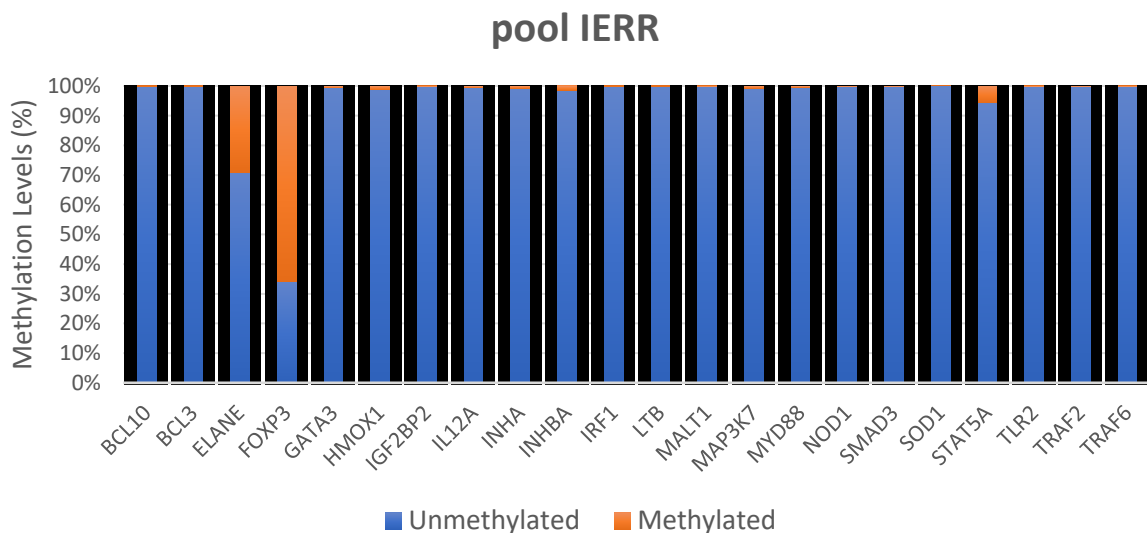
| Group function                                  | Gene Symbol  |
|---|--|
| T-cell function regulators                      | BCL10, BCL3, <i>FOXP3</i> , HMOX1, IL12 A, MALT1, MAP3K7, SOD1, STAT5A, TRAF2, TRAF6                                     |
| B-cell function regulators                      | BCL10, BCL3, INHA, INHBA, STAT5A   |
| Transcriptional regulators                      | BCL10, BCL3, <i>FOXP3</i> , GATA3, IRF1, SMAD3, STAT5A   |
| Translational regulators                        | BCL3, IGF2BP2  |
| Environment and intracellular stimuli responses | BCL10, BCL3, ELA2, <i>FOXP3</i> , GATA3, HMOX1, IL12 A, INHA, INHBA, LTB, MALT1, MYD88, NOD1, SMAD3, SOD1, STAT5A, TLR2  |
| Cytokine production signaling molecules         | BCL10, BCL3, <i>FOXP3</i> , HMOX1, INHA, INHBA, LTB, MALT1, MAP3K7, MYD88, NOD1, SMAD3, SOD1, STAT5A, TLR2, TRAF2, TRAF6 |

Data were assessed using the deltaCt-values. Relative percentages of unmethylated and methylated fractions of input DNA were obtained for each gene in both groups. Data representing DNA methylation levels were analyzed using the EpiTect Methyl II DNA PCR 96-Well Data Analysis spreadsheet, available at the manufacturer's website (Life Technologies, Carlsbad, CA).

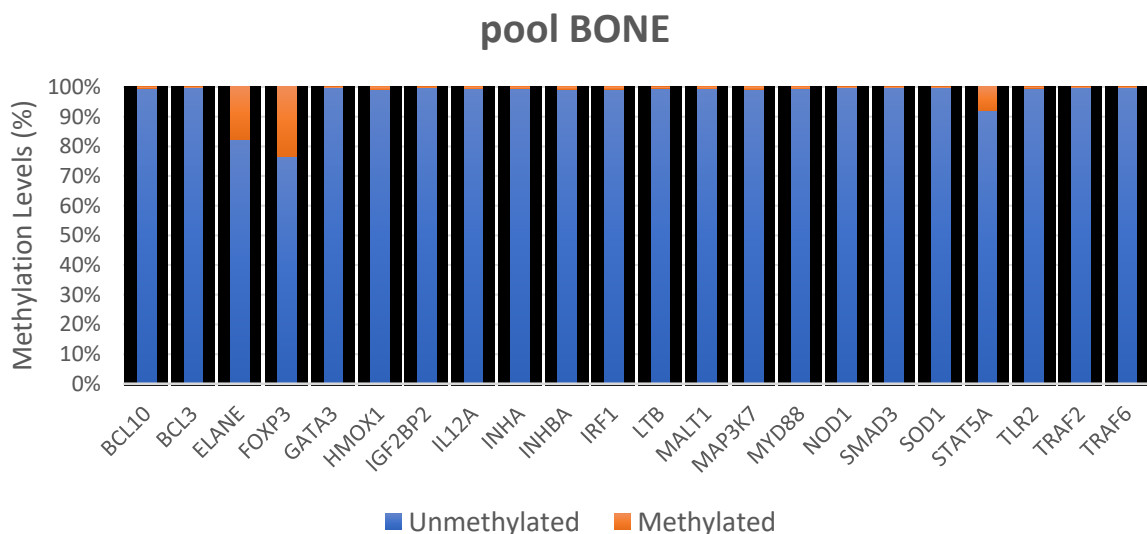
## RESULTS

The methylation levels of the promoter regions of the 22 immune response related genes in the IERR group and in the control group are presented in **Figure 1**. The results of the methylation patterns of the IERR pooled samples revealed the highest levels of DNA methylation for *FOXP3*, compared with the other investigated genes. The *FOXP3* promoter region showed 65.95% methylation levels in the IERR pool, while the normal healthy bone pool showed a markedly reduced percentage of DNA methylation (23.43%) for the same gene (**Table 2**). The other evaluated gene promoters had similar profiles between the case and control groups, presenting low methylation levels.

(A)



(B)



**FIGURE 1.** Methylation levels (%) observed in (A) pool IERR - Inflammatory External Root Resorption and (B) pool bone

**TABLE 2.** Percentage of unmethylated (UM) and methylated (M) levels in immune response genes in pool IERR and pool bone

| Gene Symbol    | Pool IERR |        | Pool bone |        |
|----------------|-----------|--------|-----------|--------|
|                | UM        | M      | UM        | M      |
| <b>BCL10</b>   | 99,98%    | 0,02%  | 99,63%    | 0,37%  |
| <b>BCL3</b>    | 99,99%    | 0,01%  | 99,73%    | 0,27%  |
| <b>ELANE</b>   | 70,93%    | 29,07% | 82,44%    | 17,56% |
| <b>FOXP3</b>   | 34,05%    | 65,95% | 76,57%    | 23,43% |
| <b>GATA3</b>   | 99,37%    | 0,63%  | 99,73%    | 0,27%  |
| <b>HMOX1</b>   | 98,74%    | 1,26%  | 99,05%    | 0,95%  |
| <b>IGF2BP2</b> | 99,81%    | 0,19%  | 99,92%    | 0,08%  |
| <b>IL12A</b>   | 99,48%    | 0,52%  | 99,39%    | 0,61%  |
| <b>INHA</b>    | 99,16%    | 0,84%  | 99,44%    | 0,56%  |
| <b>INHBA</b>   | 98,61%    | 1,39%  | 99,25%    | 0,75%  |
| <b>IRF1</b>    | 99,98%    | 0,02%  | 99,30%    | 0,70%  |
| <b>LTB</b>     | 100,00%   | 0,00%  | 99,65%    | 0,35%  |
| <b>MALT1</b>   | 99,89%    | 0,11%  | 99,43%    | 0,57%  |
| <b>MAP3K7</b>  | 99,14%    | 0,86%  | 99,23%    | 0,77%  |
| <b>MYD88</b>   | 99,55%    | 0,45%  | 99,35%    | 0,65%  |
| <b>NOD1</b>    | 99,85%    | 0,15%  | 99,76%    | 0,24%  |
| <b>SMAD3</b>   | 99,86%    | 0,14%  | 99,79%    | 0,21%  |
| <b>SOD1</b>    | 100,00%   | 0,00%  | 99,86%    | 0,14%  |
| <b>STAT5A</b>  | 94,41%    | 5,59%  | 91,92%    | 8,08%  |
| <b>TLR2</b>    | 99,90%    | 0,10%  | 99,65%    | 0,35%  |
| <b>TRAF2</b>   | 99,88%    | 0,12%  | 99,69%    | 0,31%  |
| <b>TRAF6</b>   | 99,67%    | 0,33%  | 99,83%    | 0,17%  |

## DISCUSSION

The present clinical and molecular study investigated, for the first time, the methylation status of a selected panel of important inflammatory genes related to immune response, in replanted teeth presenting IERR. These genes comprised B-cell and T-cell function regulators, transcriptional and translational regulators, as well as other genes involved in inflammatory response and immunity. The DNA methylation profile was investigated to compare a pooled sample of root fragments bearing IERR to a pooled sample of normal bone tissue. Epigenetic mechanisms, such as DNA methylation, have been shown to have an impact on the pathogenesis of other inflammatory oral diseases, including periodontitis<sup>8,12</sup> and periapical lesions<sup>13-16</sup>.

The methylation assays revealed that the *FOXP3* gene promoter had higher levels of DNA methylation in the IERR group, compared to the healthy bone group. A higher level of *FOXP3* promoter methylation was also observed in radicular cysts and

periapical granulomas <sup>14</sup>. *FOXP3* is a transcription factor considered necessary and sufficient for the development of regulatory T cells (Tregs); it is also considered the specific marker for this T cell subpopulation <sup>20-22</sup>. Treg cells represent a distinct population of T cells, induced peripherally by antigen exposure <sup>23</sup>. The role of Tregs in controlling immune response, via suppression of effector cell function and/or production of immunosuppressive cytokines, is well established <sup>21,23</sup>. In epigenetic studies, a correlation between DNA methylation and gene silencing has long been recognized. It has been suggested that DNA demethylation of the *FOXP3* promoter gene in Tregs is a prerequisite for stable protein expression and Treg development, and for the suppressive regulatory T cell phenotype. Demethylation allows *FOXP3* binding in order to maintain transcriptional activity at the *FOXP3* locus <sup>21,24-26</sup>. On the other hand, the higher level of methylation of the *FOXP3* promoter region inhibits transcription factors from binding to their DNA binding sites, since they are correlated with *FOXP3* mRNA gene expression downregulation <sup>14</sup>.

Taken together, the present findings, which show a higher methylation status of the *FOXP3* gene promoter region in the IERR group, as well as in radicular cysts and periapical granulomas <sup>14</sup>, may reflect the infectious etiopathogenesis shared by such entities. It has been shown that DNA methylation status can change rapidly in response to infection, and may have a role in innate immune response <sup>27</sup>. It has been shown that microbial pathogens, including bacteria, viruses and their virulence factors, can further deregulate the epigenetic machinery of the host cell with the intention of circumventing host defense mechanisms, thereby favoring the colonization, growth or spread of infectious pathogens <sup>28</sup>. The role of environmental factors, including bacterial infection and tissue inflammation in some oral diseases, have recently been explored and have been shown capable of inducing epigenetic changes in pulpal <sup>29,30</sup> and periodontal tissues <sup>31-33</sup>.

As the *FOXP3* promoter gene is encoded on the X chromosome, most studies choose to use only male donors in order to avoid bias due to the inactivity of the X chromosome. However, the precise regulation of *FOXP3* expression in female donors remains something of an enigma <sup>22</sup>. According to a recent study, methylation patterns of the *FOXP3* locus seems to be quite similar in both genders <sup>22</sup>. Taking this into account, together with the fact that tooth avulsion is a rare traumatic injury in permanent dentition, ranging from 0.5% to 16% <sup>34</sup>, both genders were included in the

same pool. The decision to include female donors was based on the difficulty of obtaining samples of severe IERR in teeth that cannot be saved. Therefore, in the present analysis, one female donor was included in each pool in order to match patients by gender.

The present study originally provided provocative results regarding the differential methylation patterns in an important gene involved in the immune response. This suggests that epigenetic mechanisms may participate in IERR modulation. It is noteworthy that there are no previous studies in the literature investigating the role of epigenetic regulation in root resorption modulation. However, the present data must be interpreted with caution, especially because it is necessary to assess the functional impact of DNA methylation, by verifying the expression and transcription levels of the mRNA of the *FOXP3* gene, through validation experiments using individual samples. In addition, this is a preliminary descriptive study. Multivariate analysis, to assess the effect of demographic and clinical factors in IERR activity, was not performed. It is well known that the patient's age at the time of trauma <sup>19,35</sup> and the timing of pulpectomy after replantation <sup>19,35</sup> may affect IERR activity. Therefore, future studies addressing simultaneous methylation patterns of the *FOXP3* and additional genes, as well as other clinical parameters, may also contribute to elucidate the dynamics of IERR in traumatized teeth.

## **CONCLUSION**

The present results suggest differential methylation patterns of the *FOXP3* gene in IERR, compared to healthy bone tissue; and, that this might be attributed to the presence of root canal infection. This is the first evidence of the possible participation of epigenetic events in the modulation of IERR. However, future studies are needed to corroborate these findings, so as to determine the functional relevance of this alteration and its role in the pathogenesis of IERR.

## REFERENCES

1. Trope M. Avulsion of permanent teeth: theory to practice. *Dent Traumatol.* 2011;27(4):281-94. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.2011.01003.x>
2. Abbott PV. Prevention and management of external inflammatory resorption following trauma to teeth. *Aust Dent J.* 2016;61:82-94. <https://doi.org/10.1111/adj.12400>
3. Andreasen JO, Andreasen FM. Root resorption following traumatic dental injuries. *Proc Finn Dent Soc.* 1992;88:95-114.
4. Hammarstrom L, Pierce A, Blomlof L, Feiglin B, Lindskog S. Tooth avulsion and replantation--a review. *Endod Dent Traumatol.* 1986;2(1):1-8. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.1986.tb00117.x>
5. Andreasen JO. Relationship between surface and inflammatory resorption and changes in the pulp after replantation of permanent incisors in monkeys. *J Endod.* 1981;7(7):294-301. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(81\)80095-7](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(81)80095-7)
6. Sasaki T. Differentiation and functions of osteoclasts and odontoclasts in mineralized tissue resorption. *Microsc Res Tech.* 2003;61(6):483-95. <https://doi.org/10.1002/jemt.10370>
7. Bastos JV, Silva TA, Colosimo EA, et al. Expression of Inflammatory Cytokines and Chemokines in Replanted Permanent Teeth with External Root Resorption. *J Endod.* 2017;43(2):203-9. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.10.018>
8. Larsson L. Current Concepts of Epigenetics and Its Role in Periodontitis. *Curr Oral Health Rep.* 2017;4(4):286-93. <https://doi.org/10.1007/s40496-017-0156-9>
9. Greenberg MVC, Bourc'his D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(10):590-607. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0159-6>

10. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet.* 2013;14(3):204-20. <https://doi.org/10.1038/nrg3354>
11. Barros SP, Offenbacher S. Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease. *J Dent Res.* 2009;88(5):400-8. <https://doi.org/10.1177%2F0022034509335868>
12. Schulz S, Immel UD, Just L, Schaller HG, Glaser C, Reichert S. Epigenetic characteristics in inflammatory candidate genes in aggressive periodontitis. *Hum Immunol.* 2016;77(1):71-5. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2015.10.007>
13. Campos K, Gomes CC, de Fatima Correia-Silva J, et al. Methylation pattern of IFNG in periapical granulomas and radicular cysts. *J Endod.* 2013; 39(4): 493-6. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.12.026>
14. Campos K, Franscisoni CF, Okehie V, et al. FOXP3 DNA methylation levels as a potential biomarker in the development of periapical lesions. *J Endod.* 2015; 41(2): 212-8. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.10.003>
15. Campos K, Gomes CC, Farias LC, Silva RM, Letra A, Gomez RS. DNA Methylation of MMP9 Is Associated with High Levels of MMP-9 Messenger RNA in Periapical Inflammatory Lesions. *J Endod.* 2016;42(1):127-30. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.10.002>
16. Wichnieski C, Maheshwari K, Souza LC, et al. DNA methylation profiles of immune response-related genes in apical periodontitis. *Int Endod J.* 2019;52(1):5-12. <https://doi.org/10.1111/iej.12966>
17. Roskamp L, Westphalen VD, Carneiro E, Fariniuk LF, Silva Neto UX, Westphalen FH. Relationship between extra-alveolar time and atopy in the prognosis of the replantation of avulsed teeth. *J Trauma.* 2010;69(6):E79-81. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e3181ec112b>

18. Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 4. Factors related to periodontal ligament healing. *Endod Dent Traumatol.* 1995;11(2):76-89. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.1995.tb00464.x>
19. Bastos JV, Ilma de Souza Cortes M, Andrade Goulart EM, Colosimo EA, Gomez RS, Dutra WO. Age and timing of pulp extirpation as major factors associated with inflammatory root resorption in replanted permanent teeth. *J Endod.* 2014;40(3):366-71. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.10.009>
20. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003; 299(5609):1057-61. <https://doi.org/10.1126/science.1079490>
21. Janson PCJ, Winerdal ME, Marits P, Thörn M, Ohlsson R, Winqvist O. FOXP3 Promoter Demethylation Reveals the Committed Treg Population in Humans. *PLOS ONE.* 2008;3(2):e1612. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001612>
22. Minskaia E, Saraiva BC, Soares MMV, et al. Molecular Markers Distinguishing T Cell Subtypes With TSDR Strand-Bias Methylation. *Front Immunol.* 2018;9:2540. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02540>
23. Roncarolo MG, Gregori S, Bacchetta R, Battaglia M, Gagliani N. The Biology of T Regulatory Type 1 Cells and Their Therapeutic Application in Immune-Mediated Diseases. *Immunity.* 2018;49(6):1004-19. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.12.001>
24. Baron U, Floess S, Wieczorek G, et al. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3+ conventional T cells. *Eur J Immunol.* 2007;37(9):2378-89. <https://doi.org/10.1002/eji.200737594>
25. Polansky JK, Schreiber L, Thelemann C, et al. Methylation matters: binding of Ets-1 to the demethylated Foxp3 gene contributes to the stabilization of Foxp3

- expression in regulatory T cells. *J Mol Med.* 2010;88(10):1029-40. <https://doi.org/10.1007/s00109-010-0642-1>
26. Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, Peng XP, Forbush K, Rudensky AY. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature.* 2010;463:808-12. <https://doi.org/10.1038/nature08750>
27. Pacis A, Tailleux L, Morin AM, et al. Bacterial infection remodels the DNA methylation landscape of human dendritic cells. *Genome Res.* 2015;25(12):1801-11. <https://doi.org/10.1101/gr.192005.115>
28. Niller HH, Banati F, Nagy K, Buzas K, Minarovits J. Update on microbe-induced epigenetic changes: bacterial effectors and viral oncoproteins as epigenetic dysregulators. *Fut Virol.* 2013;8(11):1111-26. <https://doi.org/10.2217/fvl.13.97>
29. Hui T, Wang C, Chen D, Zheng L, Huang D, Ye L. Epigenetic regulation in dental pulp inflammation. *Oral Dis.* 2017;23(1):22-8. <https://doi.org/10.1111/odi.12464>
30. Mo Z, Li Q, Cai L, Zhan M, Xu Q. The effect of DNA methylation on the miRNA expression pattern in lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in human dental pulp cells. *Mol Immunol.* 2019;111:11-8. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.03.012>
31. Drury JL, Chung WO. DNA methylation differentially regulates cytokine secretion in gingival epithelia in response to bacterial challenges. *Pathog Dis.* 2015;73(2):1-6. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftu005>
32. Holla S, Balaji KN. Epigenetics and miRNA during bacteria-induced host immune responses. *Epigenomics.* 2015;7(7):1197-212. <https://doi.org/10.2217/epi.15.75>
33. Luo Y, Peng X, Duan D, Liu C, Xu X, Zhou X. Epigenetic Regulations in the Pathogenesis of Periodontitis. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2018;13(2):144-50. <https://doi.org/10.2174/1574888X12666170718161740>

34. Andreasen JO, Andreasen FM, Andersson L. *Textbook and Color Atlas of Traumatic Injuries to the Teeth*. Wiley; 2007.
35. Hinckfuss SE, Messer LB. An evidence-based assessment of the clinical guidelines for replanted avulsed teeth. Part I: timing of pulp extirpation. *Dent Traumatol.* 2009; 25(1) :32-42. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.2008.00727.x>

## 5. Considerações Finais

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

### 5.1 Avaliação dos Determinantes Clínicos da ocorrência de RREI em dentes permanentes reimplantados

No presente estudo, buscou-se avaliar retrospectivamente os determinantes clínicos da atividade da RREI, antes da intervenção endodôntica, em dentes permanentes reimplantados de pacientes tratados na CDT-FAO-UFMG entre 1994 e 2018. Estudos desta natureza constituem-se uma importante contribuição uma vez que a literatura relativa aos traumatismos dentários ainda é dominada por estudos experimentais e estudos clínicos de baixo poder de evidência científica, como relatos de casos ou estudos realizados com amostras relativamente pequenas (ANDERSSON AND ANDREASEN, 2011). Neste contexto, o presente estudo traz uma importante contribuição tendo em vista o tamanho da amostra, constituída de 581 dentes reimplantados em 427 pacientes. Vale ressaltar que a estratégia adotada para análise estatística dos dados permitiu a inclusão de mais de um dente reimplantado no mesmo paciente através da utilização das Equações de Estimação Generalizadas (GEE).

Outra importante característica deste trabalho reside no fato de que houve padronização dos procedimentos adotados durante o reimplante bem como no registro de informações. Essa garantia se deu em virtude de os dois centros envolvidos no atendimento dos pacientes integrantes da amostra atual - Pronto Socorro Odontológico do Hospital Metropolitano Odilon Bherens (HMOB), onde o atendimento de urgência foi realizado, e a Clínica de Traumatismos Dentários da Faculdade de Odontologia da UFMG, onde os pacientes receberam atendimento sequencial - integrarem o Programa Traumatismos Dentários da FAO-UFMG, os quais adotam protocolos e formulários comuns desde 1994. Sendo assim, é possível assegurar que as manobras adotadas para a realização do reimplante foram rigorosamente as mesmas para toda a amostra.

Na primeira etapa, o modelo de regressão multinomial ordinal demonstrou que, dentre as variáveis estudadas, apenas a idade e o tempo entre o reimplante e a pulpectomia estavam significativamente relacionados com a ocorrência e severidade

da RREI. Este resultado corrobora estudos clínicos prévios que demonstram que o atraso na extirpação pulpar (BASTOS *et al.*, 2014; COCCIA, 1980; HINCKFUSS AND MESSER, 2009; KINIRONS *et al.*, 1999; STEWART *et al.*, 2008; WERDER *et al.*, 2011), bem como a menor idade do paciente no momento do trauma (ANDREASEN *et al.*, 1995a; BASTOS *et al.*, 2014; PETROVIC *et al.*, 2010), estão associados ao maior risco e gravidade RREI. A relação direta da pulpectomia tardia com maior ocorrência de RREI observada neste estudo é coerente com os achados da literatura que demonstraram o papel chave desempenhado pela infecção do canal radicular na etiopatogenia das RREI. A presença de bactérias no canal radicular sustenta a inflamação no LP e, conseqüentemente, é capaz de incentivar a atividade clástica na superfície externa da raiz, resultando em maior chance de um dente reimplantado desenvolver RREI (ANDREASEN, 1981a;b; HAMMARSTROM *et al.*, 1986; TROPE *et al.*, 1992; NISHIOKA *et al.*, 1998).

Em uma segunda etapa, procurou-se investigar a interação entre estas duas covariáveis, ou seja, estimar se o efeito de uma modifica o efeito da outra. O resultado significativo do teste de interação evidenciou uma interação quantitativa entre estas duas variáveis ao demonstrar que o efeito do tempo até a pulpectomia foi significativamente atenuado pelo aumento da idade do paciente no momento do trauma. Em outras palavras, o atraso no início da terapia endodôntica afeta a ocorrência e severidade da RREI de maneira dependente da idade. Este é um resultado inédito e representa uma contribuição importante ao demonstrar que a idade do paciente não é apenas um fator prognóstico relevante para a atividade de RREI, mas também um importante fator preditivo do efeito da demora no início da terapia endodôntica. O resultado desta interação sugere, em última análise, que estas duas covariáveis devem ser consideradas conjuntamente durante a tomada de decisão clínica, não só em nível individual, mas principalmente na organização e coordenação do cuidado emergencial e sequencial de pacientes portadores de dentes permanentes reimplantados.

Em situações de avulsão e reimplante dentários, as demandas são sempre agudas e urgentes, e frequentemente, há necessidade de acompanhamento em longo prazo do paciente traumatizado, em uma abordagem multidisciplinar. Desconsiderar a complexidade deste cenário no planejamento do tratamento de dentes reimplantados pode resultar em elevado custo econômico e social.

Consequentemente, o resultado aqui apresentado traz importantes subsídios para embasar deliberações eficazes que levem em consideração a maior vulnerabilidade do paciente de menor idade em situações em que a terapia endodôntica não pode ser iniciada no momento ideal.

## 5.2 Avaliação do Perfil de Metilação do DNA na RREI em dentes permanentes reimplantados

A realização deste ensaio buscou investigar, pela primeira vez, se mecanismos reguladores da expressão gênica poderiam estar envolvidos na dinâmica dos processos reabsortivos em dentes permanentes reimplantados após avulsão traumática portadores de RREI. Aqui, o perfil de metilação do DNA de um painel de 22 genes relacionados com a resposta imune foi investigado utilizando um *pool* de amostras de fragmentos radiculares de dentes portadores de RREI com indicação de exodontia, e comparado com um *pool* de amostras de tecido ósseo normal.

Os ensaios de metilação revelaram que o estado de metilação da região promotora do gene *FOXP3* na RREI difere do tecido ósseo normal. O gene *FOXP3* apresentou maior nível de metilação do DNA na RREI em comparação com o grupo osso (65,95% e 23,43% respectivamente). Os demais promotores de genes estudados tiveram um perfil similar entre os grupos, apresentando uma baixa frequência de metilação. Este resultado se assemelha aos achados de Campos *et al.* (2015), que demonstraram que o gene *FOXP3* se apresenta hipermetilado em cistos e granulomas periapicais, e que este maior nível de metilação está relacionada com menor expressão gênica.

Considerando que o principal mecanismo de indução da RREI também está relacionado com a presença de microrganismos colonizando o interior do sistema de canais radiculares (ABBOTT, 2016; TROPE, 2011), especula-se se o padrão de metilação de genes envolvidos na resposta imuno-inflamatória RREI também poderia estar alterado em função da presença da infecção. Vale ressaltar que não há na literatura estudos com amostras semelhantes que tenham buscado investigar o papel regulador da metilação na modulação da resposta imune inflamatória do indivíduo e na eficiência dos mecanismos de cicatrização em situações de reimplante

dentário. Apesar disso, o presente resultado deve ser interpretado com cautela. O impacto funcional da metilação do DNA, por meio da verificação dos níveis de expressão e transcrição do mRNA do gene *FOXP3*, não foi contemplado neste estudo. Assim sendo, estudos adicionais com enfoque especial na validação destes achados em amostras individuais são necessários para confirmar ou refutar o pressuposto aqui levantado.

Ainda assim, os resultados da presente investigação fornece parâmetros básicos e abre novas perspectivas para estudos futuros que busquem melhor compreensão dos fatores moduladores da resposta imune e sua participação na patogênese das reabsorções radiculares pós-traumáticas. Este avanço poderá estabelecer novas abordagens para o diagnóstico e tratamento destas lesões.

Referências  
Bibliográficas

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, P. V. Prevention and management of external inflammatory resorption following trauma to teeth. **Australian Dental Journal**, v. 61, n. 1, p. 82-94, 2016.

AHN, H. J.; NAM, O. H.; LEE, H. S.; KIM, E. C. *et al.* Expression of inflammatory cytokines and MMPs on replanted teeth at different extra-alveolar time: an ex vivo and in vivo study. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v. 26, n. 4, p. 301-309, 2016.

ANDERSSON, L.; BODIN, I.; SORENSEN, S. Progression of root resorption following replantation of human teeth after extended extraoral storage. **Endodontic and Dental Traumatology**, v. 5, n. 1, p. 38-47, 1989.

ANDERSSON, L.; BODIN, I.; Avulsed human teeth replanted within 15 minutes - a long-term clinical follow-up study. **Endodontic and Dental Traumatology**, v. 6, n. 1, p. 37-42, 1990.

ANDERSSON L, ANDREASEN JO. Important considerations for designing and reporting epidemiologic and clinical studies in dental traumatology. **Dental Traumatology**, v. 27, n. 4, p. 269-274, 2011.

ANDREASEN, J. O.; ANDREASEN, F. **Root resorption following traumatic dental injuries.** 1992. 95-114 p.

ANDREASEN, J. O. Relationship between surface and inflammatory resorption and changes in the pulp after replantation of permanent incisors in monkeys. **Journal of Endodontics**, v. 7, n. 7, p. 294-301, 1981a.

ANDREASEN, J. O. The effect of pulp extirpation or root canal treatment on periodontal healing after replantation of permanent incisors in monkeys. **Journal of Endodontics**, v. 7, n. 6, p. 245-252, 1981b.

ANDREASEN, J. O.; BORUM, M. K.; JACOBSEN, H. L.; ANDREASEN, F. M. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 1. Diagnosis of healing complications. **Endodontic and Dental Traumatology**, v. 11, n. 2, p. 51-58, 1995a.

ANDREASEN, J. O.; BORUM, M. K.; JACOBSEN, H. L.; ANDREASEN, F. M. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 4. Factors related to periodontal ligament healing. **Endodontic and Dental Traumatology**, v. 11, n. 2, p. 76-89, 1995b.

ANDREASEN, J. O.; HJØRTING-HANSEN, E. Replantation of teeth. I. Radiographic and clinical study of 110 human teeth replanted after accidental loss. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 24, n. 3, p. 263-286, 1966a.

ANDREASEN, J. O.; HJØRTING-HANSEN, E. Replantation of teeth. II. Histological study of 22 replanted anterior teeth in humans. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 24, n. 3, p. 287-306, 1966b.

ATTWOOD, J. T.; YUNG, R. L.; RICHARDSON, B. C. DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 59, n. 2, p. 241-257, 2002.

BARROS, S. P.; OFFENBACHER, S. Epigenetics: Connecting Environment and Genotype to Phenotype and Disease. **Journal of Dental Research**, v. 88, n. 5, p. 400-408, 2009.

BASTOS, J. V.; CORTES, M. I.; SILVA, J. F.; GOULART, E. M. *et al.* A study of the interleukin-1 gene cluster polymorphisms and inflammatory external root resorption in replanted permanent teeth. **International Endodontic Journal**, v. 48, n. 9, p. 878-887, 2015.

BASTOS, J. V.; CORTES, M. I.; ANDRADE GOULART, E. M.; COLOSIMO, E. A. *et al.* Age and timing of pulp extirpation as major factors associated with inflammatory root resorption in replanted permanent teeth. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 3, p. 366-371, 2014.

BASTOS, J. V.; SILVA, T. A.; COLOSIMO, E. A.; CÔRTEZ, M. I. S. *et al.* Expression of Inflammatory Cytokines and Chemokines in Replanted Permanent Teeth with External Root Resorption. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 2, p. 203-209, 2017.

BAYARSAIHAN, D. Epigenetic mechanisms in inflammation. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 1, p. 9-17, 2011.

BLOMLÖF, L.; LINDSKOG, S.; HAMMARSTRÖM, L. Influence of pulpal treatments on cell and tissue reactions in the marginal periodontium. **Journal of Periodontology**, v. 59, n. 9, p. 577-583, 1988.

BOYCE, B. F.; XING, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 473, n. 2, p. 139-146, 2008.

BOYD, D. H.; KINIRONS, M. J.; GREGG, T. A. A prospective study of factors affecting survival of replanted permanent incisors in children. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v. 10, n. 3, p. 200-205, 2000.

BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 337, 2003.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. Resolução n° 466, de 12 de dezembro de 2012. Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. Brasília: Diário Oficial da União, 2013.

CAMPOS, K.; FRANSCISCONI, C. F.; OKEHIE, V.; DE SOUZA, L. C. *et al.* FOXP3 DNA methylation levels as a potential biomarker in the development of periapical lesions. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 2, p. 212-218, 2015.

CAMPOS, K.; GOMES, C. C.; DE FATIMA CORREIA-SILVA, J.; FARIAS, L. C. *et al.* Methylation pattern of IFNG in periapical granulomas and radicular cysts. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 4, p. 493-496, 2013.

CAMPOS, K.; GOMES, C. C.; FARIAS, L. C.; SILVA, R. M. *et al.* DNA Methylation of MMP9 Is Associated with High Levels of MMP-9 Messenger RNA in Periapical Inflammatory Lesions. **Journal of Endodontics**, v. 42, n. 1, p. 127-130, 2016.

COCCIA, C. T. A clinical investigation of root resorption rates in reimplanted young permanent incisors: a five-year study. **Journal of Endodontics**, v. 6, n. 1, p. 413-420, 1980.

CRONA-LARSSON, G.; BJARNASON, S.; NORÉN, J.G.; Effect of luxation injuries on permanent teeth. **Dental Traumatology**, v.7, n. 5, p. 199-206, 1991.

DE FARIA AMORMINO, S. A.; ARÃO, T. C.; SARAIVA, A. M.; GOMEZ, R. S. *et al.* Hypermethylation and low transcription of TLR2 gene in chronic periodontitis. **Human Immunology**, v. 74, n. 9, p. 1231-1236, 2013.

DE NARDIN, E. Genetic polymorphisms and immune responses. **Immunological Investigations**, v. 38, n. 3-4, p. 198-202, 2009.

DE SOUZA, A. P.; PLANELLO, A. C.; MARQUES, M. R.; DE CARVALHO, D. D. *et al.* High-throughput DNA analysis shows the importance of methylation in the control of immune inflammatory gene transcription in chronic periodontitis. **Clinical Epigenetics**, v. 6, n. 1, p. 15, 2014.

DONALDSON, M; KINIRONS, M.J. Factors affecting the time of onset of resorption in avulsed and replanted incisor teeth in children. **Dental Traumatology** , v. 17, n. 5, p. 205-209, 2001.

DRURY, J. L.; CHUNG, W. O. DNA methylation differentially regulates cytokine secretion in gingival epithelia in response to bacterial challenges. **Pathogens and Disease**, v. 73, n. 2, p. 1, 2015.

FITZPATRICK, D. R.; WILSON, C. B. Methylation and demethylation in the regulation of genes, cells, and responses in the immune system. **Clinical Immunology**, v. 109, n. 1, p. 37-45, 2003.

GOLDBERG, A. D.; ALLIS, C. D.; BERNSTEIN, E. Epigenetics: a landscape takes shape. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 635-638, 2007.

GOMES, W. D.; SILVA, C. A.; MELO, M. E.; SILVA, V. F. *et al.* Delayed tooth replantation in rats: effect of systemic antibiotic therapy with amoxicillin and tetracycline. **Dental Traumatology**, v. 31, n. 6, p. 448-456, 2015.

GRAVES, D. T.; OATES, T.; GARLET, G. P. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. **Journal of Oral Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 5304, 2011.

GREENBERG, M. V. C.; BOURC'HIS, D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 10, p. 590-607, 2019.

HAMMARSTROM, L.; BLOMLOF, L.; FEIGLIN, B.; ANDERSSON, L. *et al.* Replantation of teeth and antibiotic treatment. **Endodontics and Dental Traumatology**, v.2, n. 2, p. 51-57, 1986.

HAMMARSTROM, L.; PIERCE, A.; BLOMLOF, L.; FEIGLIN, B. *et al.* Tooth avulsion and replantation--a review. **Endodontics and Dental Traumatology**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 1986.

HAMMARSTRÖM, L.; BLOMLÖF, L.; LINDSKOG, S. Dynamics of dentoalveolar ankylosis and associated root resorption. **Endodontics and Dental Traumatology**, v. 5, n. 4, p. 163-175, 1989.

HERMANN, A.; GOYAL, R.; JELTSCH, A. The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 46, p. 48350-48359, 2004.

HINCKFUSS, S. E.; MESSER, L. B. An evidence-based assessment of the clinical guidelines for replanted avulsed teeth. Part I: Timing of pulp extirpation. **Dental Traumatology**, v. 25, n. 1, p. 32-42, 2009.

HOLLA, S.; BALAJI, K. N. Epigenetics and miRNA during bacteria-induced host immune responses. **Epigenomics**, v. 7, n. 7, p. 1197-1212, 2015.

HUI, T.; WANG, C.; CHEN, D.; ZHENG, L. *et al.* Epigenetic regulation in dental pulp inflammation. **Oral Diseases**, v. 23, n. 1, p. 22-28, 2017.

KATAGIRI, T.; TAKAHASHI, N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. **Oral Diseases**, v. 8, n. 3, p. 147-159, 2002.

KINIRONS, M. J.; BOYD, D. H.; GREGG, T. A. Inflammatory and replacement resorption in reimplanted permanent incisor teeth: a study of the characteristics of 84 teeth. **Endodontics and Dental Traumatology**, v. 15, n. 6, p. 269-272, 1999.

KRISTERSON, L.; ANDREASEN, J. O. Influence of root development on periodontal and pulpal healing after replantation of incisors in monkeys. **International Journal of Oral Surgery**, v. 13, n. 4, p. 313-323, 1984.

LARSSON, L. Current Concepts of Epigenetics and Its Role in Periodontitis. **Current Oral Health Reports**, v. 4, n. 4, p. 286-293, 2017.

LARSSON, L.; CASTILHO, R. M.; GIANNOBILE, W. V. Epigenetics and Its Role in Periodontal Diseases: A State-of-the-Art Review. **Journal of Periodontology**, v. 86, n. 4, p. 556-568, 2015.

- LI, X.; LU, J.; TENG, W.; ZHAO, C. *et al.* Quantitative Evaluation of MMP-9 and TIMP-1 Promoter Methylation in Chronic Periodontitis. **DNA Cell Biology**, v. 37, n. 3, p. 168-173, 2018.
- LINDROTH, A. M.; PARK, Y. J. Epigenetic biomarkers: a step forward for understanding periodontitis. **Journal of Periodontal and Implant Science**, v. 43, n. 3, p. 111-120, 2013.
- LIU, Y.; DU, H.; WANG, Y.; LIU, M. *et al.* Osteoprotegerin-knockout mice developed early onset root resorption. **Journal of Endodontics**, v. 42, n. 10, p. 1516-1522, 2016.
- LUO, Y.; PENG, X.; DUAN, D.; LIU, C. *et al.* Epigenetic Regulations in the Pathogenesis of Periodontitis. **Current Stem Cell Research and Therapy**, v. 13, n. 2, p. 144-150, 2018.
- MANFRIN, T. M.; POI, W. R.; OKAMOTO, R.; PANZARINI, S. R. *et al.* Expression of OPG, RANK, and RANKL proteins in tooth repair processes after immediate and delayed tooth. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 24, n. 1, p. e74-80, 2013.
- MELO, M. E.; SILVA, C. A.; DE SOUZA GOMES, W. D.; DA SILVA, V. F. *et al.* Immediate tooth replantation in rats: effect of systemic antibiotic therapy with amoxicillin and tetracycline. **Clinical Oral Investigations**, v. 20, n. 3, p. 523-532, 2016.
- MO, Z.; LI, Q.; CAI, L.; ZHAN, M. *et al.* The effect of DNA methylation on the miRNA expression pattern in lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in human dental pulp cells. **Molecular Immunology**, v. 111, p. 11-18, 2019.
- MOORE, L. D.; LE, T.; FAN, G. DNA methylation and its basic function. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 1, p. 23, 2013.
- NE, R. F.; WITHERSPOON, D. E.; GUTMANN, J. L. Tooth resorption. **Quintessence International - English Edition**, v. 30, p. 9-26, 1999.
- NIELSEN, H. M.; TOST, J. Epigenetic changes in inflammatory and autoimmune diseases. *In: Epigenetics: Development and Disease*: Springer, 2013. p. 455-478.
- NILLER, H. H.; BANATI, F.; NAGY, K.; BUZAS, K. *et al.* Update on microbe-induced epigenetic changes: bacterial effectors and viral oncoproteins as epigenetic dysregulators. **Future Virology**, v. 8, n. 11, p. 1111-1126, 2013.
- NISHIOKA, M.; SHIYA, T.; UENO, K.; SUDA, H. Tooth replantation in germ-free and conventional rats. **Dental Traumatology**, v. 14, n. 4, p. 163-173, 1998.
- OKANO, M.; BELL, D. W.; HABER, D. A.; LI, E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell**, v. 99, n. 3, p. 247-257, 1999.
- PANZARINI, S. R.; OKAMOTO, R.; POI, W. R.; SONODA, C. K. *et al.* Histological and immunohistochemical analyses of the chronology of healing process after immediate tooth replantation in incisor rat teeth. **Dental Traumatology**, v. 29, n. 1, p. 15-22, 2013.

PETROVIC, B.; MARKOVIC, D.; PERIC, T.; BLAGOJEVIC, D. Factors related to treatment and outcomes of avulsed teeth. **Dental Traumatology**, 26, n. 1, p. 52-59, 2010.

PIERCE, A. M. Experimental basis for the management of dental resorption. **Endodontics and Dental Traumatology**, v. 5, n. 6, p. 255-265, 1989.

REGO, E. B.; INUBUSHI, T.; MIYAUCHI, M.; KAWAZOE, A. *et al.* Ultrasound stimulation attenuates root resorption of rat replanted molars and impairs tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling in vitro. **Journal of Periodontal Research**, v. 46, n. 6, p. 648-654, 2011.

ROSKAMP, L.; DA SILVA NETO, U. X.; CARNEIRO, E.; FARINIUK, L. F. *et al.* Influence of Atopy in the Outcome of Avulsed and Replanted Teeth during 5 Years of Follow-up. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 1, p. 25-28, 2017.

ROSKAMP, L.; TREVILATTO, P. C.; SOUZA, C. M.; SILVA NETO, U. X. *et al.* Analysis of the association of clinical factors and IL4 gene polymorphisms with root resorption in avulsed teeth after 1 year of replantation. **International Endodontic Journal**, v. 51, n. 1, p. 12-19, 2018.

SAE-LIM, V.; WANG, C. Y.; CHOI, G. W.; TROPE, M. The effect of systemic tetracycline on resorption of dried replanted dogs' teeth. **Endodontics and Dental Traumatology**, v. 14, n. 3, p. 127-132, 1998.

SAE-LIM, V.; WANG, C. Y.; TROPE, M. Effect of systemic tetracycline and amoxicillin on inflammatory root resorption of replanted dogs' teeth. **Endodontics and Dental Traumatology**, v.14, n. 5, p. 216-220, 1998.

SAITO, C. T. M. H.; GULINELLI, J. L.; PANZARINI, S. R.; GARCIA, V. G. *et al.* Effect of low-level laser therapy on the healing process after tooth replantation: a histomorphometrical and immunohistochemical analysis. **Dental Traumatology**, v. 27, n. 1, p. 30-39, 2011.

SASAKI, T. Differentiation and functions of osteoclasts and odontoclasts in mineralized tissue resorption. **Microscopy Research and Technique**, v. 61, n. 6, p. 483-495, 2003.

SCHULZ, S.; IMMEL, U. D.; JUST, L.; SCHALLER, H. G. *et al.* Epigenetic characteristics in inflammatory candidate genes in aggressive periodontitis. **Human Immunology**, v. 77, n. 1, p. 71-75, 2016.

SOUZA, B. D. M.; DUTRA, K. L.; KUNTZE, M. M.; BORTOLUZZI, E. A. *et al.* Incidence of Root Resorption after the Replantation of Avulsed Teeth: A Meta-analysis. **Journal of Endodontics**, v. 44, n. 8, p. 1216-1227, 2018.

STEWART, C. J.; ELLEDGE, R. O.; KINIRONS, M. J.; WELBURY, R. R. Factors affecting the timing of pulp extirpation in a sample of 66 replanted avulsed teeth in children and adolescents. **Dental Traumatology**, v.24, n. 6, p. 625-627, 2008.

TAKAYANAGI, H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. **Journal of Periodontal Research**, 40, n. 4, p. 287-293, 2005.

TAKAYANAGI, H. New developments in osteoimmunology. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 11, p. 684-689, 2012.

TRONSTAD, L. Root resorption -- etiology, terminology and clinical manifestations. **Endodontics and Dental Traumatology**, v.4, n. 6, p. 241-252, 1988.

TROPE, M. Avulsion of permanent teeth: theory to practice. **Dental Traumatology**, v. 27, n. 4, p. 281-294, 2011.

TROPE, M.; YESILSOY, C.; KOREN, L.; MOSHONOV, J. *et al.* Effect of different endodontic treatment protocols on periodontal repair and root resorption of replanted dog teeth. **Journal of Endodontics**, v. 18, n. 10, p. 492-496, 1992.

VIANA, M. B.; CARDOSO, F. P.; DINIZ, M. G.; COSTA, F. O. *et al.* Methylation pattern of IFN-gamma and IL-10 genes in periodontal tissues. **Immunobiology**, v.216, n. 8, p. 936-941, 2011.

WERDER, P.; VON ARX, T.; CHAPPUIS, V. Treatment outcome of 42 replanted permanent incisors with a median follow-up of 2.8 years. **Schweiz Monatsschr Zahnmed**, v. 121, n. 4, p. 312-320, 2011.

WICHNIESKI, C.; MAHESHWARI, K.; SOUZA, L. C.; NIEVES, F. *et al.* DNA methylation profiles of immune response-related genes in apical periodontitis. **International Endodontic Journal**, v. 52, n. 1, p. 5-12, 2019.

WILSON, A. G. Epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response and relevance to common diseases. **Journal of Periodontology**, v. 79, p. 1514-1519, 2008.

ZHANG, D.; GOETZ, W.; BRAUMANN, B.; BOURAUUEL, C. *et al.* Effect of soluble receptors to interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha on experimentally induced root resorption in rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 38, n. 3, p. 324-332, 2003.

ZHANG, S.; BARROS, S. P.; MORETTI, A. J.; YU, N. *et al.* Epigenetic regulation of TNFA expression in periodontal disease. **Journal of Periodontology**, v. 84, n. 11, p. 1606-1616, 2013.

ZHANG, S.; CRIVELLO, A.; OFFENBACHER, S.; MORETTI, A. *et al.* Interferon-gamma promoter hypomethylation and increased expression in chronic periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 37, n. 11, p. 953-961, 2010.



## ANEXO 1

### Termos de Consentimento/Assentimento livre e Esclarecido (TCLE/TALE)

1

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPANTES MAIORES DE 18 ANOS PORTADORES DE DENTES REIMPLANTADOS APÓS AVULSÃO TRAUMÁTICA**

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “CICATRIZAÇÃO PERIODONTAL APÓS LESÕES TRAUMÁTICAS DENTO-ALVEOLARES - INTERAÇÃO DE DETERMINANTES DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, AMBIENTAIS, IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS NOS PADRÕES DE REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA EM DENTES PERMANENTES REPLANTADOS”. Pedimos a sua autorização para a coleta, armazenamento, a utilização e descarte de material biológico humano tais como a raiz do seu dente que será extraído, fluido presente na sua gengiva e dentro do canal do seu dente”. Nesta pesquisa pretendemos verificar como foi o padrão de cicatrização do seu dente traumatizado, se existem bactérias que infectam o canal do seu dente traumatizado, identificar as substâncias produzidas pelo organismo que interferem na cicatrização de um dente traumatizado e se o perfil genético interfere nesta resposta. Além disso, faremos uma comparação com as substâncias encontradas em dentes normais que nunca sofreram trauma. Os riscos da participação nesta pesquisa estão relacionados aos procedimentos de coleta de fluido da sua gengiva e do seu canal radicular que podem aumentar a duração das consultas. A extração do dente, que só será realizada se estiver indicada como parte do seu tratamento, pode gerar dor pós-operatória, sangramento, edema. Qualquer um destes sintomas será solucionado pela equipe da Clínica de Traumatismos Dentários. Esta pesquisa ajudará a desenvolver tratamentos que permitam manter um dente traumatizado saudável por um maior período de tempo diminuindo os prejuízos emocionais, funcionais e financeiros para os PARTICIPANTES que sofrem traumatismos. A participação neste estudo não é condição necessária para que você continue sendo atendido na Clínica de Traumatismo Dentário da Faculdade de Odontologia da UFMG. Você só participará deste trabalho se voluntariamente assinar o termo de consentimento em duas vias, uma delas permanecerá com você. Você poderá desistir da participação nesta pesquisa sem nenhum prejuízo ao seu tratamento. As despesas decorrentes da participação na pesquisa serão de responsabilidade única e exclusiva dos pesquisadores envolvidos, através das Instituições às quais pertencem, não estando prevista qualquer forma de remuneração para os voluntários. Os materiais coletados serão utilizados somente para a pesquisa atual e o restante ficará congelado sob a responsabilidade da pesquisadora responsável por um período de 10 (dez) anos na Faculdade de Odontologia da UFMG. Novas pesquisas só serão realizadas com o seu consentimento e aprovação dos órgãos competentes da UFMG. O Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se e a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização da mesma. Os resultados obtidos pela pesquisa, a partir de seu material biológico, estarão à sua disposição quando finalizada. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos. O (A) Sr. (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar desta pesquisa e seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, na Faculdade de Odontologia da UFMG, e a outra será fornecida ao Sr. (a).

Rubrica do pesquisador: \_\_\_\_\_

Rubrica do participante: \_\_\_\_\_

Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento de Identidade \_\_\_\_\_ fui informado (a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa “CICATRIZAÇÃO PERIODONTAL APÓS LESÕES TRAUMÁTICAS DENTO-ALVEOLARES - INTERAÇÃO DE DETERMINANTES DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, AMBIENTAIS, IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS NOS PADRÕES DE REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA EM DENTES PERMANENTES REPLANTADOS”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

( ) Concordo que o meu material biológico seja utilizado somente para esta pesquisa.

( ) Concordo que o meu material biológico possa ser utilizado em outras pesquisa, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que será utilizado o material.

Declaro que concordo em participar desta pesquisa. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado por mim e pelo pesquisador, que me deu a oportunidade de ler e esclarecer todas as minhas dúvidas.

---

Nome completo do participante

Data

---

Assinatura do participante

**Nome completo do Pesquisador Responsável:**

Endereço:

CEP: ..... / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) .....

E-mail: .....

---

Assinatura do pesquisador responsável

Data

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

**COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG**

Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005.

Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901.

E-mail: coep@prpq.ufmg.br. Tel: 34094592.

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA RESPONSÁVEL LEGAL POR PARTICIPANTES MENORES DE 18 ANOS OU INCAPAZES, PORTADORES DE DENTES REIMPLANTADOS APÓS AVULSÃO TRAUMÁTICA**

Considerando a sua condição de responsável legal pelo(a) menor

apresentamos este convite e solicitamos o seu consentimento para que ele(a) participe da pesquisa intitulada "CICATRIZAÇÃO PERIODONTAL APÓS LESÕES TRAUMÁTICAS DENTO-ALVEOLARES - INTERAÇÃO DE DETERMINANTES DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, AMBIENTAIS, IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS NOS PADRÕES DE REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA EM DENTES PERMANENTES REPLANTADOS". Pedimos a sua autorização para a coleta, armazenamento, utilização e descarte de material biológico humano do participante sob sua responsabilidade tais como a raiz do dente que será extraído, fluido presente na gengiva e dentro do canal do dente. Nesta pesquisa pretendemos verificar como foi o padrão de cicatrização do dente traumatizado, se existem bactérias que infectam o canal do dente traumatizado, identificar as substâncias produzidas pelo organismo que interferem na cicatrização de um dente traumatizado e se o perfil genético interfere nesta resposta. Além disso, faremos uma comparação com as substâncias encontradas em dentes normais que nunca sofreram trauma. Os riscos da participação nesta pesquisa estão relacionados aos procedimentos de coleta de fluido da gengiva e do canal radicular uma vez que estes procedimentos aumentam o tempo de duração da consulta. A extração do dente, que só será realizada se estiver indicada como parte do tratamento, pode gerar dor pós-operatória, sangramento, edema. Qualquer um destes sintomas será solucionado pela equipe da Clínica de Traumatismos Dentários. Esta pesquisa ajudará a desenvolver tratamentos que permitam manter um dente traumatizado saudável por um maior período de tempo diminuindo os prejuízos emocionais, funcionais e financeiros para os PARTICIPANTES que sofrem traumatismos. A participação neste estudo não é condição necessária para que o participante continue sendo atendido na Clínica de Traumatismo Dentário da Faculdade de Odontologia da UFMG e ele só participará deste trabalho se o participante e seu responsável concordarem e voluntariamente assinarem os termos de consentimento e assentimento em duas vias, uma delas permanecerá com vocês. Vocês poderão desistir da participação nesta pesquisa sem nenhum prejuízo ao tratamento. As despesas decorrentes da participação na pesquisa serão de responsabilidade única e exclusiva dos pesquisadores envolvidos, através das Instituições às quais pertencem, não estando prevista qualquer forma de remuneração para os voluntários. Os materiais coletados serão utilizados somente para a pesquisa atual e o restante ficará congelado sob a responsabilidade da pesquisadora responsável por um período de 10 (dez) anos na Faculdade de Odontologia da UFMG. Novas pesquisas só serão realizadas com o consentimento do participante e/ou seu responsável e aprovação dos órgãos competentes da UFMG. O Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização da mesma. Os resultados obtidos pela pesquisa, a partir de seu material biológico, estarão à sua disposição quando finalizada. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos. O (A) Sr. (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar desta pesquisa e seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, na Faculdade de Odontologia da UFMG, e a outra será fornecida ao Sr. (a).

Rubrica do pesquisador: \_\_\_\_\_  
Rubrica do responsável pelo participante: \_\_\_\_\_

Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento de Identidade \_\_\_\_\_, responsável pelo menor \_\_\_\_\_

fui informado (a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa “CICATRIZAÇÃO PERIODONTAL APÓS LESÕES TRAUMÁTICAS DENTO-ALVEOLARES - INTERAÇÃO DE DETERMINANTES DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, AMBIENTAIS, IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS NOS PADRÕES DE REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA EM DENTES PERMANENTES REPLANTADOS”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de autorizar a participação do menor sob minha responsabilidade se assim o desejar.

(  ) Concordo que o material biológico do participante sob minha responsabilidade seja utilizado somente para esta pesquisa.

(  ) Concordo que o material biológico do participante sob minha responsabilidade possa ser utilizado em outras pesquisas, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que fim será utilizado o material.

Declaro, na qualidade de responsável pelo menor \_\_\_\_\_ concordo que ele participe desta pesquisa. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado por mim e pelo pesquisador, que me deu a oportunidade de ler e esclarecer todas as minhas dúvidas.

---

Nome completo do responsável

Data

---

Assinatura do Responsável legal pelo participante participante da pesquisa

**Nome completo do Pesquisador Responsável:**

Endereço:

CEP: ..... / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) .....

E-mail: .....

---

Assinatura do pesquisador responsável

Data

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

**COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG**

Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005.

Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901.

E-mail: coep@prpq.ufmg.br. Tel: 34094592.

**TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPANTES MENORES, COM IDADES ENTRE 14 e 18 ANOS, PORTADORES DE DENTES REIMPLANTADOS APÓS AVULSÃO TRAUMÁTICA**

Você. (a) está sendo convidado (a) a participar da pesquisa “CICATRIZAÇÃO PERIODONTAL APÓS LESÕES TRAUMÁTICAS DENTO-ALVEOLARES - INTERAÇÃO DE DETERMINANTES DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, AMBIENTAIS, IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS NOS PADRÕES DE REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA EM DENTES PERMANENTES REPLANTADOS”. Pedimos a sua autorização para a coleta, armazenamento, a utilização e descarte de material biológico humano tais como a raiz do seu dente que será extraído, fluido presente na sua gengiva e dentro do canal do seu dente”. Nesta pesquisa pretendemos verificar como foi o padrão de cicatrização do seu dente traumatizado, se existem bactérias que infectam o canal do seu dente traumatizado, identificar as substâncias produzidas pelo organismo que interferem na cicatrização de um dente traumatizado e se o perfil genético interfere nesta resposta. Além disso, faremos uma comparação com as substâncias encontradas em dentes normais que nunca sofreram trauma. Os riscos da participação nesta pesquisa estão relacionados aos procedimentos de coleta de fluido da sua gengiva e do seu canal radicular que podem aumentar a duração das consultas. A extração do dente, que só será realizada se estiver indicada como parte do seu tratamento, pode gerar dor pós-operatória, sangramento, edema. Qualquer um destes sintomas será solucionado pela equipe da Clínica de Traumatismos Dentários. A participação neste estudo não é condição necessária para que você continue sendo atendido na Clínica de Traumatismo Dentário da Faculdade de Odontologia da UFMG. Você não gastará nada para participar e também não vai receber nenhuma forma de pagamento. Mas sua participação contribuirá para aumentar o conhecimento sobre a cicatrização de dentes traumatizados e o que podemos fazer para que eles permaneçam por mais tempo depois do trauma. Os materiais coletados serão utilizados somente para a pesquisa atual e o restante ficará congelado sob a responsabilidade da pesquisadora responsável por um período de 10 (dez) anos na Faculdade de Odontologia da UFMG. Novas pesquisas só serão realizadas com o seu consentimento e de seus responsáveis, além da aprovação dos órgãos competentes da UFMG. Você pode perguntar qualquer informação sobre a pesquisa e só participará deste trabalho se você quiser e pode desistir quando quiser. Isso não prejudicará seu tratamento. Os resultados obtidos pela pesquisa, a partir de seu material biológico, estarão à sua disposição quando finalizada. Você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar desta pesquisa e seu nome ou o material que indique sua participação, não será liberado sem a sua permissão. Você ficará com uma via deste termo de assentimento. Toda pesquisa realizada na Faculdade de Odontologia da UFMG é avaliada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais – COEP/UFMG. No caso de dúvida, você também poderá obter informações sobre os aspectos éticos desta pesquisa no COEP/UFMG, Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º. Andar – Sala 2005 Campus Pampulha Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901, e-mail: coep@prpq.ufmg.br, ou pelo telefone (31) 3409 4592.

Rubrica do pesquisador: \_\_\_\_\_

Rubrica do participante: \_\_\_\_\_

Eu \_\_\_\_\_  
aceito participar da pesquisa "CICATRIZAÇÃO PERIODONTAL APÓS LESÕES TRAUMÁTICAS DENTO-ALVEOLARES - INTERAÇÃO DE DETERMINANTES DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, AMBIENTAIS, IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS NOS PADRÕES DE REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA EM DENTES PERMANENTES REPLANTADOS". Entendi o que será feito e que mesmo tendo aceitado participar posso, a qualquer momento, desistir sem nenhum problema. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi e li uma VIA deste termo de assentimento e concordo em participar da pesquisa.

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Responsável pela pesquisa

**Nome completo do Pesquisador Responsável:**

Endereço:

CEP: ..... / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) .....

E-mail: .....

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

**COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG**

Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005.

Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901.

E-mail: coep@prpq.ufmg.br. Tel: 34094592.

**TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPANTES MENORES, COM IDADES ENTRE 10 e 13 ANOS, PORTADORES DE DENTES REIMPLANTADOS APÓS AVULSÃO TRAUMÁTICA**

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “CICATRIZAÇÃO PERIODONTAL APÓS LESÕES TRAUMÁTICAS DENTO-ALVEOLARES - INTERAÇÃO DE DETERMINANTES DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, AMBIENTAIS, IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS NOS PADRÕES DE REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA EM DENTES PERMANENTES REPLANTADOS”. Queremos identificar as substâncias que as suas células estão produzindo que podem influenciar na cicatrização do seu dente traumatizado, verificar se existem bactérias dentro do canal radicular do seu dente traumatizado e se a sua genética interfere cicatrização do seu dente traumatismo. Para estudarmos estas substâncias precisamos coletar pedaços do seu dente que será extraído para obter as células, coletar um pouco de fluido da sua gengiva e do material que está dentro do seu canal. Estes procedimentos de coleta serão feitos durante o seu tratamento e não provocarão nenhum incomodo mas podem aumentar o tempo da consulta. O seu dente só será extraído se for necessário para o seu tratamento. Esta pesquisa vai nos ajudar a desenvolver tratamentos para manter os dentes traumatizados por mais tempo. As crianças e adolescentes que irão participar dessa pesquisa têm de 7 a 18 anos de idade. Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu e não terá nenhum problema se desistir. A pesquisa será feita aqui na Faculdade de Odontologia pela equipe da Clínica de Traumatismos Dentários. Caso aconteça algo errado, você pode nos procurar. Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa vão ser publicados, mas sem identificar as crianças que participaram da pesquisa. Se você tiver alguma dúvida, você pode procurar a Profa. Juliana Vilela Bastos pelos telefones (31) 3409 2454 e (31) 999786430. Toda pesquisa realizada na Faculdade de Odontologia da UFMG é avaliada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais – COEP/UFMG. No caso de dúvida, você também poderá obter informações sobre os aspectos éticos desta pesquisa no COEP/UFMG, Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º. Andar – Sala 2005 Campus Pampulha Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901, E-mail: coep@prpq.ufmg.br, ou pelo telefone (31) 3409 4592.

*Rubrica do pesquisador:* \_\_\_\_\_

*Rubrica do participante:* \_\_\_\_\_

Eu \_\_\_\_\_  
aceito participar da pesquisa "CICATRIZAÇÃO PERIODONTAL APÓS LESÕES TRAUMÁTICAS DENTO-ALVEOLARES - INTERAÇÃO DE DETERMINANTES DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, AMBIENTAIS, IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS NOS PADRÕES DE REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA EM DENTES PERMANENTES REPLANTADOS". Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer "sim" e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer "não" e desistir sem nenhum problema. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma VIA deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Responsável pela pesquisa

**Nome completo do Pesquisador Responsável:**

Endereço:

CEP: ..... / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) .....

E-mail: .....

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

**COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG**

Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005.

Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901.

E-mail: coep@prpq.ufmg.br. Tel: 34094592.

**TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPANTES MENORES, COM IDADES ENTRE 7 e 9 ANOS, PORTADORES DE DENTES REIMPLANTADOS APÓS AVULSÃO TRAUMÁTICA**

Temos um convite para te fazer: quer participar de uma pesquisa que estamos fazendo aqui na Clínica de Traumatismos Dentários? O nome da pesquisa é “CICATRIZAÇÃO PERIODONTAL APÓS LESÕES TRAUMÁTICAS DENTO-ALVEOLARES - INTERAÇÃO DE DETERMINANTES DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, AMBIENTAIS, IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS NOS PADRÕES DE REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA EM DENTES PERMANENTES REPLANTADOS”. Que nome complicado, não?! Mas vou te explicar: queremos descobrir o que aconteceu lá dentro do seu dente depois que você machucou. Será que na hora do trauma bactérias entraram no seu dente? Será que elas estão atrapalhando a cura do seu dente? Mas o nosso corpo tem armas que nos ajudam a combater as bactérias. Quem será que está ganhando esta batalha? As bactérias ou as defesas do nosso corpo? Será que os seus genes estão programados para vencer a luta contra as bactérias? Para responder estas perguntas vamos pegar um pedacinho do seu dente (mas só quando ele estiver quase caindo), um pouquinho da sua saliva e do líquido que tem dentro do seu dente para examinar tudo no laboratório, com aparelhos especiais. Nada do que vamos fazer vai te machucar ou assustar, mas sua consulta pode demorar um pouco mais. Se você ficar cansado nós vamos parar e marcaremos outra consulta. Esta pesquisa vai nos ensinar a cuidar dos dentes traumatizados para que eles fiquem por muito tempo na boca mesmo depois de machucados e você possa dar um sorriso bem bonito! As crianças e adolescentes que irão participar dessa pesquisa têm de 7 a 18 anos de idade. Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu e não terá nenhum problema se desistir. A pesquisa será feita aqui na Faculdade de Odontologia pela equipe da Clínica de Traumatismos Dentários. Se você tiver alguma dúvida, você pode perguntar para a Profa. Juliana Vilela Bastos ou pedir para quem cuida de você falar com ela nos telefones (31) 3409 2454 e (31) 999786430. O que descobirmos nesta pesquisa, vamos contar para os dentistas do mundo todo também aprenderem a cuidar de dentes traumatizados. Mas eles não vão saber o seu nome nem informações sobre você e sua família. Toda pesquisa realizada na Faculdade de Odontologia da UFMG é avaliada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais – COEP/UFMG. No caso de dúvida, você ou quem cuida de você também poderá obter informações sobre os aspectos éticos desta pesquisa no COEP/UFMG, Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º. Andar – Sala 2005 Campus Pampulha Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901, E-mail: coep@prpq.ufmg.br, ou pelo telefone (31) 3409 4592.

Rubrica do pesquisador: \_\_\_\_\_

Rubrica do participante: \_\_\_\_\_

Eu \_\_\_\_\_  
aceito participar da pesquisa "CICATRIZAÇÃO PERIODONTAL APÓS LESÕES TRAUMÁTICAS DENTO-ALVEOLARES - INTERAÇÃO DE DETERMINANTES DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, AMBIENTAIS, IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS NOS PADRÕES DE REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA EM DENTES PERMANENTES REPLANTADOS". Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer "sim" e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer "não" e desistir sem nenhum problema. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma VIA deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Responsável pela pesquisa

**Nome completo do Pesquisador Responsável:**

Endereço:

CEP: ..... / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) .....

E-mail: .....

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

**COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG**

Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2ª andar - Sala 2005.

Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901.

E-mail: coep@prpq.ufmg.br. Tel: 34094592.

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA COLETA DE DADOS DOS PRONTUÁRIOS DE PARTICIPANTES MAIORES DE 18 ANOS, PORTADORES DE DENTES REIMPLANTADOS APÓS AVULSÃO TRAUMÁTICA**

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “CICATRIZAÇÃO PERIODONTAL APÓS LESÕES TRAUMÁTICAS DENTO-ALVEOLARES - INTERAÇÃO DE DETERMINANTES DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, AMBIENTAIS, IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS NOS PADRÕES DE REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA EM DENTES PERMANENTES REPLANTADOS”. Pedimos a sua autorização para utilizar o seu prontuário e coletar informações sobre sua idade e sexo, sobre as causas e tipo de traumatismos que você teve, sobre os cuidados imediatos com você e com o seu dente traumatizados, sobre o tratamento emergencial e outros que você recebeu após o trauma. Também vamos analisar os resultados dos seus exames clínicos, exames por imagem (radiografias e tomografias) e exames complementares. Nesta pesquisa pretendemos verificar o que aconteceu com o seu dente após o replante do seu dente e quais foram os fatores que influenciaram na cicatrização ou não. Além disso, faremos uma comparação com dentes normais que nunca sofreram trauma. Esta pesquisa ajudará a desenvolver tratamentos que permitam manter um dente reimplantado saudável por um maior período de tempo diminuindo os prejuízos emocionais, funcionais e financeiros para os PARTICIPANTES que sofrem traumatismos. A participação neste estudo não é condição necessária para que você continue sendo atendido na Clínica de Traumatismo Dentário da Faculdade de Odontologia da UFMG. Você só participará deste trabalho se voluntariamente assinar o termo de consentimento em duas vias, uma delas permanecerá com você. Você poderá desistir da participação nesta pesquisa sem nenhum prejuízo ao seu tratamento. As despesas decorrentes da participação na pesquisa serão de responsabilidade única e exclusiva dos pesquisadores envolvidos, através das Instituições às quais pertencem, não estando prevista qualquer forma de remuneração para os voluntários. Os riscos da participação nesta pesquisa estão relacionados com a divulgação indevida da sua identidade e dos seus dados. Entretanto, somente a professora coordenadora da pesquisa e os pesquisadores autorizados poderão ter acesso aos seus dados. Estes pesquisadores se comprometeram a tratar sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos. O (A) Sr. (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar desta pesquisa e seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. As informações coletadas serão utilizados somente para a pesquisa atual e novas pesquisas só serão realizadas com o seu consentimento e aprovação dos órgãos competentes da UFMG. O Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se e a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, pode retirar o consentimento de utilização das informações sobre o seu dente traumatizado. Os resultados obtidos pela pesquisa, a partir de seus dados, estarão à sua disposição quando finalizada. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, na Faculdade de Odontologia da UFMG, e a outra será fornecida ao Sr. (a).

*Rubrica do pesquisador:* \_\_\_\_\_  
*Rubrica do participante:* \_\_\_\_\_

Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento de Identidade \_\_\_\_\_ fui informado (a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa “CICATRIZAÇÃO PERIODONTAL APÓS LESÕES TRAUMÁTICAS DENTO-ALVEOLARES - INTERAÇÃO DE DETERMINANTES DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, AMBIENTAIS, IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS NOS PADRÕES DE REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA EM DENTES PERMANENTES REPLANTADOS”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

(  ) Concordo que o meu prontuário seja utilizado somente para esta pesquisa.

(  ) Concordo que o meu prontuário possa ser utilizado em outras pesquisa, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que será utilizado o material.

Declaro que concordo em participar desta pesquisa. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado por mim e pelo pesquisador, que me deu a oportunidade de ler e esclarecer todas as minhas dúvidas.

---

Nome completo do participante

Data

---

Assinatura do participante

**Nome completo do Pesquisador Responsável:**

Endereço:

CEP: ..... / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) .....

E-mail: .....

---

Assinatura do pesquisador responsável

Data

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

**COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG**

Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005.

Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901.

E-mail: coep@prpq.ufmg.br. Tel: 34094592.

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA COLETA DE DADOS DOS PRONTUÁRIOS DE PARTICIPANTES MENORES DE 18 ANOS OU INCAPAZES, PORTADORES DE DENTES REIMPLANTADOS APÓS AVULSÃO TRAUMÁTICA A SER ASSINADO PELO RESPONSÁVEL LEGAL**

Considerando a sua condição de responsável legal pelo(a) menor

apresentamos este convite e solicitamos o seu consentimento para que ele(a) participe da pesquisa intitulada "CICATRIZAÇÃO PERIODONTAL APÓS LESÕES TRAUMÁTICAS DENTO-ALVEOLARES - INTERAÇÃO DE DETERMINANTES DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, AMBIENTAIS, IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS NOS PADRÕES DE REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA EM DENTES PERMANENTES REPLANTADOS". Pedimos a sua autorização utilizar o prontuário do participante sob sua responsabilidade e coletar informações tais como: idade e sexo, causas e tipo de traumatismos, sobre os cuidados imediatos com o participante e com o dente traumatizado, sobre o tratamento emergencial e outros que ele recebeu após o trauma. Também vamos analisar os resultados dos exames clínicos, exames por imagem (radiografias e tomografias) e exames complementares. Nesta pesquisa pretendemos verificar o que aconteceu com os dentes após o replante e quais foram os fatores que influenciaram na cicatrização ou não. Além disso, faremos uma comparação com dentes normais que nunca sofreram trauma. Esta pesquisa ajudará a desenvolver tratamentos que permitam que um dente reimplantado possa permanecer na boca por um maior período de tempo diminuindo os prejuízos emocionais, funcionais e financeiros para os PARTICIPANTES que sofrem traumatismos. A participação neste estudo não é condição necessária para que o participante continue sendo atendido na Clínica de Traumatismo Dentário da Faculdade de Odontologia da UFMG. O participante só participará deste trabalho se voluntariamente assinar o termo de assentimento e o responsável assinar o termo de consentimento, em duas vias, uma delas permanecerá com o participante e com o responsável. O participante e seu responsável poderão desistir da participação nesta pesquisa sem nenhum prejuízo ao tratamento Na Clínica de Traumatismos dentários da FO UFMG. As despesas decorrentes da participação na pesquisa serão de responsabilidade única e exclusiva dos pesquisadores envolvidos, através das Instituições às quais pertencem, não estando prevista qualquer forma de remuneração para os voluntários. Os riscos da participação nesta pesquisa estão relacionados com a divulgação indevida da identidade e dos dados dos PARTICIPANTES. Entretanto, somente a professora coordenadora da pesquisa e os pesquisadores autorizados poderão ter acesso aos dados. Estes pesquisadores se comprometeram a tratar a identidade dos PARTICIPANTES com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos. O (A) participante não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar desta pesquisa e o nome ou o material que indique a participação não será liberado sem a permissão do participante e de seu responsável. As informações coletadas serão utilizadas somente para a pesquisa atual e novas pesquisas só serão realizadas com o consentimento do participante e do responsável e aprovação dos órgãos competentes da UFMG. O participante e o responsável serão esclarecidos sobre tudo o que será feito na pesquisa e estará livre para participar ou recusar podendo retirar, a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, o consentimento de utilização das informações sobre o seu dente traumatizado. Os resultados obtidos pela pesquisa, a partir de seus dados, estarão à sua disposição quando finalizada.

Rubrica do pesquisador: \_\_\_\_\_

Rubrica do responsável pelo participante: \_\_\_\_\_

Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento de Identidade \_\_\_\_\_, responsável pelo menor \_\_\_\_\_

fui informado (a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa “CICATRIZAÇÃO PERIODONTAL APÓS LESÕES TRAUMÁTICAS DENTO-ALVEOLARES - INTERAÇÃO DE DETERMINANTES DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, AMBIENTAIS, IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS NOS PADRÕES DE REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA EM DENTES PERMANENTES REPLANTADOS”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de autorizar a participação do menor sob minha responsabilidade se assim o desejar.

(  ) Concordo que o prontuário do participante sob minha responsabilidade seja utilizado somente para esta pesquisa.

(  ) Concordo que o prontuário do participante sob minha responsabilidade possa ser utilizado em outras pesquisa, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que fim será utilizado o material.

Declaro, na qualidade de responsável pelo menor \_\_\_\_\_ concordo que ele participe desta pesquisa. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado por mim e pelo pesquisador, que me deu a oportunidade de ler e esclarecer todas as minhas dúvidas.

---

Nome completo do responsável

Data

---

Assinatura do Responsável legal pelo participante participante da pesquisa

**Nome completo do Pesquisador Responsável:**

Endereço:

CEP: ..... / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) .....

E-mail: .....

---

Assinatura do pesquisador responsável

Data

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

**COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG**

Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005.

Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901.

E-mail: coep@prpq.ufmg.br. Tel: 34094592.

**TERMO DE ASSENTIMENTO PARA COLETA DE DADOS DOS PRONTUÁRIOS DE PARTICIPANTES MENORES, COM IDADES ENTRE 14 e 18 ANOS, PORTADORES DE DENTES REIMPLANTADOS APÓS AVULSÃO TRAUMÁTICA**

Você. (a) está sendo convidado (a) a participar da pesquisa “CICATRIZAÇÃO PERIODONTAL APÓS LESÕES TRAUMÁTICAS DENTO-ALVEOLARES - INTERAÇÃO DE DETERMINANTES DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, AMBIENTAIS, IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS NOS PADRÕES DE REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA EM DENTES PERMANENTES REPLANTADOS”. Pedimos a sua autorização para utilizar o seu prontuário e coletar informações sobre sua idade e sexo, sobre as causas e tipo de traumatismos que você teve, sobre os cuidados imediatos com você e com o seu dente traumatizados, sobre o tratamento emergencial e outros que você recebeu após o trauma. Também vamos analisar os resultados dos seus exames clínicos, por imagem (radiografias e tomografias) e complementares. Nesta pesquisa pretendemos verificar o que aconteceu com o seu dente após o replante e quais foram os fatores que fizeram que cicatrizasse ou não. Além disso, faremos uma comparação com dentes normais que nunca sofreram trauma. Esta pesquisa ajudará a desenvolver tratamentos que permitam manter um dente reimplantado saudável por um maior período de tempo diminuindo os prejuízos emocionais, funcionais e financeiros para os PARTICIPANTES que sofrem traumatismos. A participação neste estudo não é condição necessária para que você continue sendo atendido na Clínica de Traumatismo Dentário da Faculdade de Odontologia da UFMG. Você só participará deste trabalho se voluntariamente assinar o termo de assentimento e o seu responsável assinar o termo de consentimento, em duas vias, uma delas permanecerá com vocês. Você não gastará nada para participar e também não vai receber nenhuma forma de pagamento. Os riscos da participação nesta pesquisa estão relacionados com a divulgação indevida da sua identidade e dos seus dados. Entretanto, somente a professora coordenadora da pesquisa e os pesquisadores autorizados poderão ter acesso aos seus dados. Estes pesquisadores se comprometeram a tratar sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos. Você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar desta pesquisa e seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. As informações coletadas serão utilizadas somente para a pesquisa atual e novas pesquisas só serão realizadas com o seu consentimento e de seu responsável, além da aprovação dos órgãos competentes da UFMG. Você pode perguntar qualquer coisa sobre a pesquisa e está livre para desistir, mesmo depois de ter concordado, a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos para o seu tratamento. Os resultados obtidos pela pesquisa, a partir de seus dados, estarão à sua disposição quando finalizada.

*Rubrica do pesquisador:* \_\_\_\_\_

*Rubrica do participante:* \_\_\_\_\_

Eu \_\_\_\_\_  
aceito participar da pesquisa "CICATRIZAÇÃO PERIODONTAL APÓS LESÕES TRAUMÁTICAS DENTO-ALVEOLARES - INTERAÇÃO DE DETERMINANTES DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, AMBIENTAIS, IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS NOS PADRÕES DE REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA EM DENTES PERMANENTES REPLANTADOS". Entendi o que será feito e que mesmo tendo aceitado participar posso, a qualquer momento, desistir sem nenhum problema. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi e li uma VIA deste termo de assentimento e concordo em participar da pesquisa.

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Responsável pela pesquisa

**Nome completo do Pesquisador Responsável:**

Endereço:

CEP: ..... / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) .....

E-mail: .....

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

**COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG**

Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005.

Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901.

E-mail: coep@prpq.ufmg.br. Tel: 34094592.

**TERMO DE ASSENTIMENTO PARA COLETA DE DADOS DOS PRONTUÁRIOS DE PARTICIPANTES MENORES, COM IDADES ENTRE 10 e 13 ANOS, PORTADORES DE DENTES REIMPLANTADOS APÓS AVULSÃO TRAUMÁTICA**

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “CICATRIZAÇÃO PERIODONTAL APÓS LESÕES TRAUMÁTICAS DENTO-ALVEOLARES - INTERAÇÃO DE DETERMINANTES DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, AMBIENTAIS, IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS NOS PADRÕES DE REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA EM DENTES PERMANENTES REPLANTADOS”. Queremos saber como aconteceu o seu trauma, como o seu dente ficou guardado, por quanto tempo, como foram os primeiros socorros, como foi feito o atendimento emergencial, se você tomou algum remédio e se você recebeu algum tratamento para este dente traumatizado fora da Clínica de Traumatismos Dentários fora da UFMG. Também vamos analisar os resultados dos seus exames clínicos, das suas radiografias e tomografias para verificar o que aconteceu com o seu dente após o replante e quais foram os fatores que fizeram que cicatrizasse ou não. Além disso, faremos uma comparação com dentes normais que nunca sofreram trauma. Esta pesquisa ajudará a desenvolver tratamentos que permitam que o dente replantado possa ficar na boca por muito tempo e o participante possa comer, sorrir, beijar e falar normalmente. Você só participará deste trabalho se quiser e se o responsável por você aceitar. Você não precisa aceitar para continuar o seu tratamento aqui na Clínica. Você não gastará nada para participar e também não vai receber nenhuma forma de pagamento. Somente a professora coordenadora da pesquisa e os pesquisadores autorizados poderão ter acesso às informações sobre você e o seu dente. Estes pesquisadores se comprometeram a não falar para outras pessoas as informações que eles vão coletar e seu nome não aparecerá em nenhuma publicação que possa resultar desta pesquisa sem a sua permissão. As informações coletadas serão utilizadas somente para a pesquisa atual e novas pesquisas só serão realizadas com o seu consentimento e de seu responsável, além da aprovação dos órgãos competentes da UFMG. Você pode perguntar qualquer coisa sobre a pesquisa e está livre para desistir, mesmo depois de ter concordado, a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos para o seu tratamento. Os resultados obtidos pela pesquisa, a partir de seus dados, estarão à sua disposição quando finalizada.

*Rubrica do pesquisador:* \_\_\_\_\_  
*Rubrica do participante:* \_\_\_\_\_

Eu \_\_\_\_\_  
aceito participar da pesquisa "CICATRIZAÇÃO PERIODONTAL APÓS LESÕES TRAUMÁTICAS DENTO-ALVEOLARES - INTERAÇÃO DE DETERMINANTES DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, AMBIENTAIS, IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS NOS PADRÕES DE REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA EM DENTES PERMANENTES REPLANTADOS". Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer "sim" e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer "não" e desistir sem nenhum problema. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma VIA deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Responsável pela pesquisa

**Nome completo do Pesquisador Responsável:**

Endereço:

CEP: ..... / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) .....

E-mail: .....

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

**COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG**

Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005.

Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901.

E-mail: coep@prpq.ufmg.br. Tel: 34094592.

**TERMO DE ASSENTIMENTO PARA COLETA DE DADOS DOS PRONTUÁRIOS DE PARTICIPANTES MENORES, COM IDADES ENTRE 7 e 9 ANOS, PORTADORES DE DENTES REIMPLANTADOS APÓS AVULSÃO TRAUMÁTICA**

Temos um convite para te fazer: quer participar de uma pesquisa que estamos fazendo aqui na Clínica de Traumatismos Dentários? O nome da pesquisa é “CICATRIZAÇÃO PERIODONTAL APÓS LESÕES TRAUMÁTICAS DENTO-ALVEOLARES - INTERAÇÃO DE DETERMINANTES DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, AMBIENTAIS, IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS NOS PADRÕES DE REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA EM DENTES PERMANENTES REPLANTADOS”. Meio complicado, não? Mas vou te explicar: queremos saber o que aconteceu com o seu dente. Como você machucou o seu dente? Quanto tempo o seu dente ficou fora da boca? Quem encontrou o dente? Onde ele ficou até vocês procurarem o dentista? Você tomou algum remédio? Vamos olhar as informações que anotamos sobre o seu caso toda vez que você vem na Clínica de Traumatismos da UFMG e as suas radiografias para saber como ficou o seu dente depois que colocaram ele de volta. Será que ele vai ficar bom? O que pode ajudar o dente para ele ficar muito tempo e você poder dar um sorriso bem bonito? Esta pesquisa vai nos ajudar a desenvolver tratamentos para manter os dentes traumatizados por mais tempo. As crianças e adolescentes que irão participar dessa pesquisa têm de 7 a 18 anos de idade. Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu e não terá nenhum problema se desistir. A pesquisa será feita aqui na Faculdade de Odontologia pela equipe da Clínica de Traumatismos Dentários. Caso aconteça algo errado, você pode nos procurar. Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. O que descobirmos nesta pesquisa vamos contar para os dentistas do mundo todo também aprenderem a cuidar de dentes traumatizados. Mas eles não vão saber o seu nome nem informações sobre você e sua família. Se você tiver alguma dúvida, você pode perguntar para a Profa. Juliana Vilela Bastos ou pedir para sua mãe falar com ela nos telefones (31) 3409 2454 e (31) 999786430.

*Rubrica do pesquisador:* \_\_\_\_\_

*Rubrica do participante:* \_\_\_\_\_

Eu \_\_\_\_\_  
 aceito participar da pesquisa "CICATRIZAÇÃO PERIODONTAL APÓS LESÕES TRAUMÁTICAS DENTO-ALVEOLARES - INTERAÇÃO DE DETERMINANTES DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, AMBIENTAIS, IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS NOS PADRÕES DE REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA EM DENTES PERMANENTES REPLANTADOS". Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer "sim" e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer "não" e desistir sem nenhum problema. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma VIA deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Responsável pela pesquisa

**Nome completo do Pesquisador Responsável:**

Endereço:

CEP: ..... / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) .....

E-mail: .....

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

**COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG**

Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005.

Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901.

E-mail: coep@prpq.ufmg.br. Tel: 34094592.

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPANTES MAIORES DE 18 ANOS PORTADORES DE PRÉ-MOLARES COM INDICAÇÃO DE EXODONTIA POR MOTIVOS ORTODÔNTICOS – GRUPO CONTROLE**

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “CICATRIZAÇÃO PERIODONTAL APÓS LESÕES TRAUMÁTICAS DENTO-ALVEOLARES - INTERAÇÃO DE DETERMINANTES DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, AMBIENTAIS, IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS NOS PADRÕES DE REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA EM DENTES PERMANENTES REPLANTADOS”. Pedimos a sua autorização para a coleta, armazenamento, a utilização e descarte de material biológico humano tais como a raiz do seu dente que será extraído e o fluido presente na sua gengiva. Nesta pesquisa pretendemos comparar as informações observadas nos seus exames por imagem e as substâncias encontradas em dentes como o seu, que nunca sofreram trauma, com aquelas encontradas em dentes que sofreram traumatismos e apresentam diferentes padrões de cicatrização. Os riscos da participação nesta pesquisa estão relacionados aos procedimentos de coleta de fluido da sua gengiva que podem aumentar a duração da consulta. A extração do dente, que só será realizada se estiver indicada como parte do seu tratamento, pode gerar dor pós-operatória, sangramento, edema. Qualquer um destes sintomas será solucionado pela equipe da Clínica de Traumatismos Dentários. Esta pesquisa ajudará a desenvolver tratamentos que permitam manter um dente traumatizado saudável por um maior período de tempo diminuindo os prejuízos emocionais, funcionais e financeiros para os PARTICIPANTES que sofrem traumatismos. A participação neste estudo não é condição necessária para que você continue sendo atendido na Clínica de Ortodontia da Faculdade de Odontologia da UFMG. Você só participará deste trabalho se voluntariamente assinar o termo de consentimento em duas vias, uma delas permanecerá com você. Você poderá desistir da participação nesta pesquisa sem nenhum prejuízo ao seu tratamento. As despesas decorrentes da participação na pesquisa serão de responsabilidade única e exclusiva dos pesquisadores envolvidos, através das Instituições às quais pertencem, não estando prevista qualquer forma de remuneração para os voluntários. Os materiais coletados serão utilizados somente para a pesquisa atual e o restante ficará congelado sob a responsabilidade da pesquisadora responsável por um período de 10 (dez) anos na Faculdade de Odontologia da UFMG. Novas pesquisas só serão realizadas com o seu consentimento e aprovação dos órgãos competentes da UFMG. O Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se e a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização da mesma. Os resultados obtidos pela pesquisa, a partir de seu material biológico, estarão à sua disposição quando finalizada. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos. O (A) Sr. (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar desta pesquisa e seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão.

*Rubrica do pesquisador:* \_\_\_\_\_

*Rubrica do participante:* \_\_\_\_\_

Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento de Identidade \_\_\_\_\_ fui informado (a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa “CICATRIZAÇÃO PERIODONTAL APÓS LESÕES TRAUMÁTICAS DENTO-ALVEOLARES - INTERAÇÃO DE DETERMINANTES DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, AMBIENTAIS, IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS NOS PADRÕES DE REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA EM DENTES PERMANENTES REPLANTADOS”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

( ) Concordo que o meu material biológico seja utilizado somente para esta pesquisa.

( ) Concordo que o meu material biológico possa ser utilizado em outras pesquisa, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que será utilizado o material.

Declaro que concordo em participar desta pesquisa. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado por mim e pelo pesquisador, que me deu a oportunidade de ler e esclarecer todas as minhas dúvidas.

---

Nome completo do participante

Data

---

Assinatura do participante

**Nome completo do Pesquisador Responsável:**

Endereço:

CEP: ..... / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) .....

E-mail: .....

---

Assinatura do pesquisador responsável

Data

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

**COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG**

Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005.

Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901.

E-mail: coep@prpq.ufmg.br. Tel: 34094592.

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA RESPONSÁVEL LEGAL POR PARTICIPANTES MENORES DE 18 ANOS OU INCAPAZES, PORTADORES DE PRÉ-MOLARES COM INDICAÇÃO DE EXODONTIA POR MOTIVOS ORTODÔNTICOS – GRUPO CONTROLE**

Considerando a sua condição de responsável legal pelo(a) menor

\_\_\_\_\_

apresentamos este convite e solicitamos o seu consentimento para que ele(a) participe da pesquisa intitulada “CICATRIZAÇÃO PERIODONTAL APÓS LESÕES TRAUMÁTICAS DENTO-ALVEOLARES - INTERAÇÃO DE DETERMINANTES DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, AMBIENTAIS, IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS NOS PADRÕES DE REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA EM DENTES PERMANENTES REPLANTADOS”. Pedimos a sua autorização para a coleta, armazenamento, utilização e descarte de material biológico humano do participante sob sua responsabilidade tais como a raiz do dente que será extraído e fluido presente na gengiva. Nesta pesquisa pretendemos comparar as informações observadas nos exames por imagem do participante e as substâncias encontradas em dentes que nunca sofreram trauma, com aquelas encontradas em dentes que sofreram traumatismos e apresentam diferentes padrões de cicatrização. Os riscos da participação nesta pesquisa estão relacionados aos procedimentos de coleta de fluido da sua gengiva que podem aumentar a duração da consulta. A extração do dente, que só será realizada se estiver indicada como parte do tratamento, pode gerar dor pós-operatória, sangramento, edema. Qualquer um destes sintomas será solucionado pela equipe da Clínica de Traumatismos Dentários. Esta pesquisa ajudará a desenvolver tratamentos que permitam manter um dente traumatizado saudável por um maior período de tempo diminuindo os prejuízos emocionais, funcionais e financeiros para os PARTICIPANTES que sofrem traumatismos. A participação neste estudo não é condição necessária para que o participante continue sendo atendido na Clínica de Ortodontia da Faculdade de Odontologia da UFMG e ele só participará deste trabalho se o participante e seu responsável concordarem e voluntariamente assinarem os termos de consentimento e assentimento em duas vias, uma delas permanecerá com vocês. Vocês poderão desistir da participação nesta pesquisa sem nenhum prejuízo ao tratamento. As despesas decorrentes da participação na pesquisa serão de responsabilidade única e exclusiva dos pesquisadores envolvidos, através das Instituições às quais pertencem, não estando prevista qualquer forma de remuneração para os voluntários. Os materiais coletados serão utilizados somente para a pesquisa atual e o restante ficará congelado sob a responsabilidade da pesquisadora responsável por um período de 10 (dez) anos na Faculdade de Odontologia da UFMG. Novas pesquisas só serão realizadas com o consentimento do participante e/ou seu responsável e aprovação dos órgãos competentes da UFMG. O Sr. (a) e o participante serão esclarecidos sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estarão livres para desistir a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização da mesma. Os resultados obtidos pela pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos. O participante não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar desta pesquisa e seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão.

*Rubrica do pesquisador:* \_\_\_\_\_

*Rubrica do responsável pelo participante:* \_\_\_\_\_

Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento de Identidade \_\_\_\_\_, responsável pelo menor \_\_\_\_\_

fui informado (a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa “CICATRIZAÇÃO PERIODONTAL APÓS LESÕES TRAUMÁTICAS DENTO-ALVEOLARES - INTERAÇÃO DE DETERMINANTES DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, AMBIENTAIS, IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS NOS PADRÕES DE REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA EM DENTES PERMANENTES REPLANTADOS”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de autorizar a participação do menor sob minha responsabilidade se assim o desejar.

(  ) Concordo que o material biológico do participante sob minha responsabilidade seja utilizado somente para esta pesquisa.

(  ) Concordo que o material biológico do participante sob minha responsabilidade possa ser utilizado em outras pesquisas, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que fim será utilizado o material.

Declaro, na qualidade de responsável pelo menor \_\_\_\_\_ concordo que ele participe desta pesquisa. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado por mim e pelo pesquisador, que me deu a oportunidade de ler e esclarecer todas as minhas dúvidas.

---

|                              |      |
|------------------------------|------|
| Nome completo do responsável | Data |
|------------------------------|------|

---

Assinatura do Responsável legal pelo participante participante da pesquisa

**Nome completo do Pesquisador Responsável:**

Endereço:

CEP: ..... / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) .....

E-mail: .....

---

|                                       |      |
|---------------------------------------|------|
| Assinatura do pesquisador responsável | Data |
|---------------------------------------|------|

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

**COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG**

Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005.

Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901.

E-mail: coep@prpq.ufmg.br. Tel: 34094592.

**TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPANTES MENORES, COM IDADES ENTRE 12 e 18 ANOS, PORTADORES DE PRÉ-MOLARES COM INDICAÇÃO DE EXODONTIA POR MOTIVOS ORTODÔNTICOS – GRUPO CONTROLE**

Você. (a) está sendo convidado (a) a participar da pesquisa “CICATRIZAÇÃO PERIODONTAL APÓS LESÕES TRAUMÁTICAS DENTO-ALVEOLARES - INTERAÇÃO DE DETERMINANTES DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, AMBIENTAIS, IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS NOS PADRÕES DE REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA EM DENTES PERMANENTES REPLANTADOS”. Pedimos a sua autorização para a coleta, armazenamento, a utilização e descarte de material biológico humano tais como a raiz do seu dente que será extraído e fluido presente na sua gengiva. Nesta pesquisa pretendemos comparar as informações observadas nas suas radiografias e as substâncias encontradas em dentes como o seu, que nunca sofreram trauma, com aquelas encontradas em dentes que sofreram traumatismos e apresentam diferentes padrões de cicatrização. Os riscos da participação nesta pesquisa estão relacionados aos procedimentos de coleta de fluido da sua gengiva que podem aumentar a duração da consulta. A extração do dente, que só será realizada se estiver indicada como parte do seu tratamento, pode gerar dor pós-operatória, sangramento, edema. Qualquer um destes sintomas será solucionado pela equipe da Clínica de Traumatismos Dentários. Esta pesquisa ajudará a desenvolver tratamentos que permitam manter um dente por um maior período de tempo após o reimplante. Assim os PARTICIPANTES poderão sorrir, falar, comer normalmente. A participação neste estudo não é condição necessária para que você continue sendo atendido na Clínica de Ortodontia da Faculdade de Odontologia da UFMG. Você só participará deste trabalho se voluntariamente assinar o termo de consentimento em duas vias, uma delas permanecerá com você. Você poderá desistir da participação nesta pesquisa sem nenhum prejuízo ao seu tratamento. Você não gastará nada para participar e também não vai receber nenhuma forma de pagamento. Os materiais coletados serão utilizados somente para a pesquisa atual e o restante ficará congelado sob a responsabilidade da pesquisadora responsável por um período de 10 (dez) anos na Faculdade de Odontologia da UFMG. Novas pesquisas só serão realizadas com o seu consentimento e aprovação dos órgãos competentes da UFMG. Você pode perguntar qualquer coisa que queira saber sobre o projeto e poderá desistir a qualquer tempo, sem quaisquer prejuízos, podendo retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização da mesma. Você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar desta pesquisa e seu nome ou o material que indique sua participação, não será liberado sem a sua permissão. Toda pesquisa realizada na Faculdade de Odontologia da UFMG é avaliada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais – COEP/UFMG. No caso de dúvida, você também poderá obter informações sobre os aspectos éticos desta pesquisa no COEP/UFMG, Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º. Andar – Sala 2005 Campus Pampulha Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901, e-mail: coep@prpq.ufmg.br, ou pelo telefone (31) 3409 4592.

Rubrica do pesquisador: \_\_\_\_\_

Rubrica do participante: \_\_\_\_\_

Eu \_\_\_\_\_

aceito participar da pesquisa "CICATRIZAÇÃO PERIODONTAL APÓS LESÕES TRAUMÁTICAS DENTO-ALVEOLARES - INTERAÇÃO DE DETERMINANTES DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, AMBIENTAIS, IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS NOS PADRÕES DE REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA EM DENTES PERMANENTES REPLANTADOS". Entendi o que será feito e que mesmo tendo aceitado participar posso, a qualquer momento, desistir sem nenhum problema. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi e li uma VIA deste termo de assentimento e concordo em participar da pesquisa.

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Responsável pela pesquisa

**Nome completo do Pesquisador Responsável:**

Endereço:

CEP: ..... / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) .....

E-mail: .....

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

**COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG**

Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005.

Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901.

E-mail: coep@prpq.ufmg.br. Tel: 34094592.

## ANEXO 2

### Termo de Compromisso de Utilização de Dados (TCUD)

#### Termo de Compromisso de Utilização de Dados (TCUD)

##### 1. Identificação dos membros do grupo de pesquisa

| Nome completo (sem abreviação)   | RG            |
|----------------------------------|---------------|
| Juliana Vilela Bastos            | MG 3.255.497  |
| Daniela Augusta Barbato Ferreira | MG 8.144.967  |
| Silvia Cury Costa                | MG13.896.574  |
| Roberta Gabriela Amaro           | MG 11.930.849 |
| Mariana Rocha Diniz Arantes      | MG 18.295.557 |
| Thiago Cesar da Silva Lima       | MG 18.945.149 |
| Amanda Cristina de Lima Vieira   | MG 19.549.623 |
| Jade Rios Campos                 | MG17.863.598  |
| Lucas Alves da Rocha Araújo      | MG17.581.570  |
| Marina Marques Dutra             | MG 18.276.672 |
| Amanda Silva Simões              | MG 18.682.548 |

##### 2. Identificação da pesquisa

a) Título do Projeto: **Cicatrização periodontal após lesões traumáticas dento-alveolares - interação de determinantes demográficos, clínicos, ambientais, imunológicos e genéticos nos padrões de reabsorção radicular externa em dentes permanentes replantados**

b) Departamento/Faculdade/Curso: Programa Traumatismos Dentários, Departamento De Odontologia Restauradora, Faculdade De Odontologia

c) Pesquisador Responsável: Profa. Juliana Vilela Bastos

##### 3. Descrição dos Dados

Serão coletados, após aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (CEP-UFMG), dados clínicos e imaginológicos de pacientes portadores de dentes permanentes reimplantados após avulsão traumática encaminhados para tratamento no Programa de Traumatismos Dentários da faculdade de Odontologia da UFMG durante o período de 1993 a 2019.

Dados a serem coletados somente) e (comitês de ética coparticipantes, se aplicável); dados demográficos (sexo e idade), dados relativos ao momento do trauma: (data do trauma, elemento dental acometido; grau de rizogênese, número de dentes avulsionados e número de dentes reimplantados, ocorrência

de outras lesões traumáticas concomitantes no dente avulsionado ( trincas, fraturas de esmalte, fraturas de esmalte e dentina, fraturas com exposição pulpar, fraturas radiculares, fraturas de processo alveolar); dados relativos ao manejo do dente avulsionado(período extra-alveolar e condições de armazenamento); dados relativos ao tratamento de urgência (realização e tempo de imobilização, prescrição de antibioticoterapia sistêmica, tratamento da superfície radicular); dados relativos ao tratamento sequencial (realização e tempo decorrido entre o reimplante e o tratamento endodôntico radical; realização e tempo de medicação intra-canal com CaOH<sub>2</sub>); dados radiográficos e tomográficos relativos à cicatrização pulpar e periodontal de dentes avulsionados.

Os dados obtidos na pesquisa somente serão utilizados para o projeto vinculado. Para dúvidas de aspecto ético, pode ser contactado o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (CEP/UFMG): Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha – Belo Horizonte – MG – CEP 31270-901 Unidade Administrativa II – 2º Andar – Sala: 2005 Telefone: (031) 3409-4592 – E-mail: coep@prpq.ufmg.br .






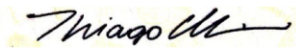
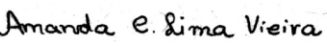


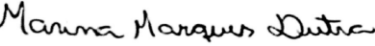
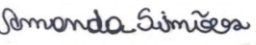
#### **4. Declaração dos pesquisadores**

Os pesquisadores envolvidos no projeto se comprometem a manter a confidencialidade sobre os dados coletados nos arquivos da **Clinica de Traumatismos Dentários da Faculdade de Odontologia da UFMG**, bem como a privacidade de seus conteúdos, como preconizam a Resolução 466/12, e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde.

Declaramos entender que a integridade das informações e a garantia da confidencialidade dos dados e a privacidade dos indivíduos que terão suas informações acessadas estão sob nossa responsabilidade. Também declaramos que não repassaremos os dados coletados ou o banco de dados em sua íntegra, ou parte dele, a pessoas não envolvidas na equipe da pesquisa.

Os dados obtidos na pesquisa somente serão utilizados para este projeto. Todo e qualquer outro uso que venha a ser planejado, será objeto de novo projeto de pesquisa, que será submetido à apreciação do CEP UFMG.

Devido à impossibilidade de obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de todos os sujeitos, assinaremos esse Termo de Consentimento de Uso de Banco de Dados, para a salvaguarda dos direitos dos participantes.

| Nome completo (sem abreviação)   | Assinatura   |
|----------------------------------|--|
| Juliana Vilela Bastos            |    |
| Daniela Augusta Barbato Ferreira |     |
| Silvia Cury Costa                |    |
| Roberta Gabriela Amaro           |     |
| Mariana Rocha Diniz Arantes      |   |
| Thiago Cesar da Silva Lima       |  |
| Amanda Cristina de Lima Vieira   |  |
| Jade Rios Campos                 |  |
| Lucas Alves da Rocha Araújo      |  |
| Marina Marques Dutra             |  |
| Amanda Silva Simões              |  |

Belo Horizonte, 30 de Abril de 2019.

**ANEXO 3****Parecer Consubstanciado do CEP**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DA EMENDA**

**Título da Pesquisa:** CICATRIZAÇÃO PERIODONTAL APÓS LESÕES TRAUMÁTICAS DENTO-ALVEOLARES - INTERAÇÃO DE DETERMINANTES DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, AMBIENTAIS, IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS NOS PADRÕES DE REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA EM DENTES PERMANENTES REPLANTADOS

**Pesquisador:** Juliana Vilela Bastos

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 4

**CAAE:** 11883119.9.0000.5149

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**Patrocinador Principal:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 3.568.782

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de projeto relevante da área de odontologia para o "estudo clínico e experimental com pacientes portadores de dentes permanentes reimplantados após avulsão traumática atendidos na Clínica de Traumatismos Dentários da Faculdade de Odontologia da UFMG. A pesquisa envolve a coleta de dados do prontuários para a determinação do padrão de cicatrização periodontal após o replante de dentes permanentes bem como seus determinantes. Além disso, serão coletados materiais biológicos tais como fragmentos radiculares de dentes com indicação de extração e fluido intra-canal para condução de análises laboratoriais sobre o perfil imunoinflamatório de diferentes tipos de reabsorção radicular externa e identificação da microbiota presente no sistema de canais radiculares de dentes permanentes reimplantados portadores de necrose pulpar." A pesquisa apresenta financiamento e parceria internacional, além do envolvimento de alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado.

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4592

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 3.568.782

**Objetivo da Pesquisa:**

Apresenta como objetivos: "Objetivo Primário:

O presente estudo tem como objetivo geral avaliar o efeito de determinantes demográficos, clínicos, ambientais, imunológicos e genéticos nos padrões de cicatrização periodontal de dentes permanentes reimplantados entre pacientes atendidos na Clínica de Traumatismos Dentários da FOUFGM

Objetivo Secundário:

1) Determinar o padrão de cicatrização periodontal em dentes permanentes reimplantados e sua associação com determinantes demográficos, relacionados às condições de manejo do elemento avulsionado, à ocorrência de outras lesões traumáticas concomitantes e ao tratamento do dentes avulsionado.2) Determinar o padrão celular e molecular de diferentes tipos de RRE pós traumática em fragmentos radiculares de dentes extraídos portadores de RREI e RRES..3) Avaliar o padrão de metilação de um painel de genes selecionados e sua expressão fenotípica em pacientes portadores de dentes reimplantados após avulsão com diferentes padrões de RRE.4) Investigar a composição da microbiota endodôntica oriunda de dentes permanentes reimplantados após avulsão traumática diagnosticados com necrose pulpar."

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos e benefícios estão adequadamente descritos e apresentados da seguinte maneira: "Riscos: Não existem riscos decorrentes da pesquisa pois os pacientes não serão submetidos a nenhum procedimento específico para a pesquisa.a Os riscos indiretos estão relacionados com os tratamentos realizados na Clínica de Traumatismos Dentários da FO UFGM ( Extração e tratamento endodôntico radical). Problemas tais como dor pós-operatória, edema, alveolite serão tratados e monitorados pela equipe da CTD FO UFGM, conforme protocolos da UFGM.

Benefícios:

Não existem benefícios diretos para os pacientes envolvidos na pesquisa. Entretanto, diante da alta prevalência das RRE após reimplantes de dentes permanentes e do grande impacto que a perda precoce dos incisivos centrais superiores

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos,6627 2º Ad SI 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4592

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 3.568.782

pode acarretar no desenvolvimento físico e psicossocial de crianças e adolescentes, faixa etária mais acometida, e para suas famílias, é de grande relevância a compreensão da patogênese e dos fatores de susceptibilidade envolvidos no desenvolvimento de formas graves das RRE. Estudos desta natureza são de grande relevância, pois, além de contribuir para o conhecimento da patogênese e controle dessas importantes entidades, abrem novas perspectivas para o tratamento e manutenção de dentes avulsionados mesmo quando reimplantados em condições desfavoráveis."

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa é relevante, apresenta parcerias internacionais e envolvimento de vários laboratórios e profissionais da FO/UFMG. Alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado envolvidos.

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

Folha de rosto preenchida e assinada

Aprovação do projeto pela chefia do departamento de odontologia restauradora

Parecer da Câmara Departamental do Departamento de odontologia restauradora

Informações Básicas do projeto

Anuências dos seguintes locais: departamento de odontologia restauradora da FOUFGM, laboratório de cultivo celular da FOUFGM, laboratório de biologia oral da FO da Universidade da Carolina do Norte, laboratório de patologia oral da FOUFGM, laboratório de biologia molecular da FOUFGM e laboratório de microbiologia oral e anaeróbios do ICB/UFMG.

Cartas respondidas ao COEP, datadas de 23/06/19, 01/07/19, 09/07/19.

Na terceira carta ao COEP observa-se que todas as solicitações, deste colegiado, para ajuste dos TCLE e TALE foram cumpridas.

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

Como todas as solicitações de correções foram atendidas, sou, S.M.J., favorável à aprovação.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4592

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 3.568.782

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento  | Arquivo                                      | Postagem               | Autor                 | Situação |
|---|--|------------------------|-----------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto  | PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_1394854_E1.pdf        | 27/07/2019<br>20:13:03 |                       | Aceito   |
| Outros  | CartaRespostaCOEP3.pdf                       | 27/07/2019<br>20:11:54 | Juliana Vilela Bastos | Aceito   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência             | TCLETALEBiorrepositorioProntuarioControl.pdf | 27/07/2019<br>20:11:15 | Juliana Vilela Bastos | Aceito   |
| Outros  | CartarespostaCOEP2.pdf                       | 01/07/2019<br>19:05:59 | Juliana Vilela Bastos | Aceito   |
| Outros  | AnuenciasLaboratorios.pdf                    | 24/06/2019<br>17:21:59 | Juliana Vilela Bastos | Aceito   |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador                             | ProjetoUncPort.pdf                           | 24/06/2019<br>17:12:31 | Juliana Vilela Bastos | Aceito   |
| Outros  | TCUD.pdf                                     | 24/06/2019<br>17:10:01 | Juliana Vilela Bastos | Aceito   |
| Outros  | CartaRespostaCOEP.pdf                        | 24/06/2019<br>17:01:55 | Juliana Vilela Bastos | Aceito   |
| Outros  | ParecerCamara.pdf                            | 04/04/2019<br>20:36:45 | Juliana Vilela Bastos | Aceito   |
| Outros  | AnuenciaODR.pdf                              | 04/04/2019<br>20:35:33 | Juliana Vilela Bastos | Aceito   |
| Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco | TCB.pdf                                      | 04/04/2019<br>20:35:05 | Juliana Vilela Bastos | Aceito   |
| Outros  | OficioODR.PDF                                | 26/02/2019<br>22:30:13 | Juliana Vilela Bastos | Aceito   |
| Folha de Rosto  | FR.pdf                                       | 11/02/2019<br>19:37:34 | Juliana Vilela Bastos | Aceito   |

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4592

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 3.568.782

BELO HORIZONTE, 11 de Setembro de 2019

---

**Assinado por:**  
**Eliane Cristina de Freitas Rocha**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4592

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

## ANEXO 4

Produção científica durante o curso (Artigo publicado 01)

## Clinical Research



## Expression of Inflammatory Cytokines and Chemokines in Replanted Permanent Teeth with External Root Resorption

Juliana Vilela Bastos, *PbD*,\* Tarcília A. Silva, *PbD*,<sup>†</sup> Enrico A. Colosimo, *PbD*,<sup>‡</sup> Maria Ilma S. Côrtes, *PbD*,<sup>§</sup> Daniela Augusta B. Ferreira, *DDS*,\* Eugenio Marcos A. Goulart, *PbD*,<sup>||</sup> Ricardo S. Gomez, *PbD*,<sup>†</sup> and Walderez O. Dutra, *PbD*<sup>¶</sup>

### Abstract

**Introduction:** The progressive forms of inflammatory external root resorption (IERR) and replacement external root resorption (RERR) are serious complications and the main causes of tooth loss after replantation. This study aimed to investigate the expression pattern of inflammatory molecules in extracted human teeth presenting with external root resorption (ERR) after replantation. **Methods:** Root fragments from 22 teeth showing IERR and 20 teeth with RERR were triturated using a homogenizer to extract inflammatory molecules. Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-1Ra, transforming growth factor beta, IL-8/CXCL8, CCL2, CCL3, and CCL5 were measured using double-ligand enzyme-linked immunosorbent assay, and IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, tumor necrosis factor alpha, interferon gamma, and IL-17A detection was performed using the multiplex Th1/Th2/Th17 Cytometric Bead Array kit (BD Biosciences, San Jose, CA). Cytokine and chemokine concentrations were compared in the RERR and IERR groups corrected by patients' age at the moment of extraction, survival time after replantation, and index of ERR, adopting a generalized estimation equation model. **Results:** The IERR group showed higher levels of tumor necrosis factor alpha than the RERR group, even after correction for the index of ERR ( $P < .05$ ). IL-1Ra levels were higher in the IERR group for moderate cases but higher in the RERR group for severe cases ( $P < .05$ ). IL-4 concentration became higher with the increase of patients' age in the RERR group but did not vary in the IERR group ( $P < .05$ ). CCL2 levels decreased with the increase of the patients' age at the moment of extraction irrespective of the type or index of ERR ( $P < .05$ ). **Conclusions:** The present results showed differences in the immunologic profile of IERR and RERR that may be relevant to understanding the biological mechanisms underlying ERR. (*J Endod* 2017;43:203–209)

### Key Words

Avulsion, chemokines, cytokines, inflammatory external root resorption, replacement external root resorption, replantation

**E**xternal root resorption (ERR) represents a serious complication after replantation of avulsed teeth, and its progressive forms, replacement external root resorption (RERR) and inflammatory external root resorption

(IERR), are the main causes of replanted tooth loss (1). The pathogenesis of progressive ERR involves an initial injury that allows the attachment of preosteoclasts to the root surface and their subsequent final differentiation and activation (2). Such an initial stimulus, in both types, is the mechanical damage to the periodontal ligament (PL) and the cementoblastic layer during the displacement of the tooth. Damage to the PL also results from an extended extraoral storage of the tooth in an unsuitable medium (3). However, the progression of the resorption process is dependent on additional factors that continuously stimulate recruitment, differentiation, and activation of the resorptive cells. IERR is supported by the immune response against bacteria and their by-products present inside the root canal that reach the damaged PL through dentinal tubules. Such an etiopathogenesis of IERR was suggested by experimental (4) and clinical studies showing that adequate endodontic treatment prevented or eliminated IERR (5). On the other hand, RERR results from the loss of large areas of PL in the absence of infection occurring at the expenses of stem cells derived from the alveolar side of the socket (6). This healing process leads to the incorporation of the root into the normal remodeling process of the alveolus, resulting in the gradual replacement of tooth structure by bone. The regulatory mechanisms of RERR are incompletely understood, and there is no effective treatment so far (2, 6). Cytokines play a pivotal role in modulating the cellular events involved in bone resorption and also have been suggested to participate in tooth resorption (7, 8). The imbalance between inflammatory and anti-inflammatory cytokines was implicated in the onset and

### Significance

This article provided a great contribution to the understanding of the molecular mechanisms underlying external root resorption in replanted teeth. This is a first step to manipulate clastic activity, a key point to maintaining avulsed teeth replanted under unsuitable conditions.

From the \*Dental Trauma Program, Department of Restorative Dentistry, <sup>†</sup>Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, <sup>‡</sup>Department of Statistics, Institute of Exact Sciences, <sup>§</sup>Department of Pediatrics, School of Medicine, and <sup>¶</sup>Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; <sup>||</sup>Department of Dentistry, Pontifical University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; and <sup>¶</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia-Doenças Tropicais (INCT-DT), Belo Horizonte, Brazil

Address requests for reprints to Dr Juliana Vilela Bastos, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Campus Pampulha Av Presidente, Antônio Carlos 6627, CEP 312709: 01, Belo Horizonte, Brazil. E-mail address: julianavb7@yahoo.com.br 0099-2399/\$ - see front matter

Copyright © 2016 American Association of Endodontists.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2016.10.018>

## Clinical Research

progression of physiologic primary root resorption (9) and external apical root resorption (EARR) after orthodontic movement (10). Zhang et al (11) showed that interleukin-1 (IL-1) and, more particularly, tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) were important for the induction and progression of mechanically induced ERR in rats. Rego et al (12) showed that the impairment of the TNF- $\alpha$  signaling pathways decreased the severity of ERR on replanted rat molars. Chemokines also play a crucial role in regulating cell trafficking during inflammatory and homeostatic bone remodeling (13, 14). The role of chemokines in oral inflammatory diseases is well established (15) and has also been suggested to play a role in dentin matrix dissolution (15, 16). Nonetheless, there is little information regarding the specific role of these soluble factors during ERR after trauma. Therefore, the present study aimed to investigate the expression patterns of inflammatory cytokines and chemokines in teeth extracted from patients presenting with IERR and RERR after replantation.

### Materials and Methods

#### Subjects and Teeth

The sample was composed of 40 patients, 30 males (75%) and 10 females (25%), from the dental trauma clinic at the faculty of dentistry of Federal University of Minas Gerais in Belo Horizonte, Brazil. Forty-two replanted permanent teeth referred for extraction with different stages of ERR were included. The control group comprised 5 patients with 12 mature premolars with required extraction for orthodontic reasons with good periodontal health and no radiographic evidence of periodontal bone loss. Patients who used systemic drugs that may interfere with bone metabolism; patients who underwent antibiotic, anti-inflammatory, hormonal, or other assisted drug therapy within 6 months before the study; patients with primary or secondary acute periodontitis; or females who were pregnant or breastfeeding were not included in the study. The study was performed with the informed consent of the patients and their guardians and was approved by the Committee on Ethics in Research of the Federal University of Minas Gerais.

#### Radiographic Assessment of Type and Extension of ERR

Periapical radiographs taken at the moment of extraction and assigned with a code were independently blindly examined by 2 investigators (J.V.B. and M.I.S.C.). Radiographic standardization followed established criteria, which were described elsewhere (17). Data regarding the presence and extension of the external root resorption were assessed using the root resorption index developed by Andersson

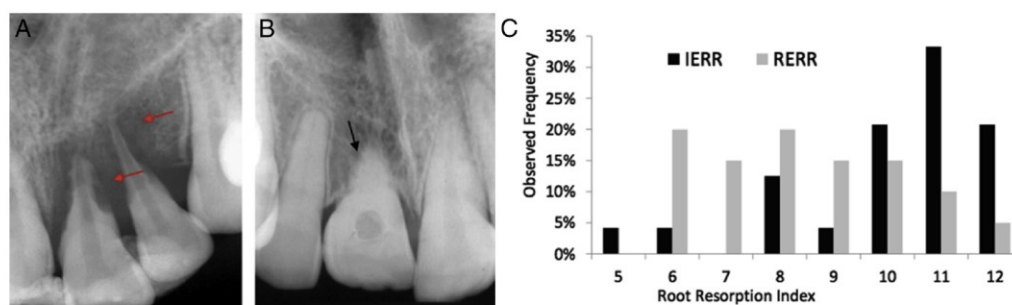
et al (18). Bowl-shaped radiolucencies in the resorption area were classified as IERR (Fig. 1A). Bone structures in the resorption area and loss of the periodontal space in the resorption area were classified as RERR (Fig. 1B) according to Andreasen et al's criteria (19).

#### Sample Preparation

Immediately after extraction, the crowns were separated under saline irrigation. The root fragments were weighed, stored in buffer solution (0.4 mmol/L sodium chloride, 10 mmol/L NaPO<sub>4</sub>, pH = 7.4) containing protease inhibitors (0.1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1 mmol/L benzethonium chloride, 10 mmol/L EDTA, and 0.01 mg/mL aprotinin A) and Tween 20 (VETEC, Sigma-Aldrich, Duque de Caxias, RS, Brazil) (0.05%, pH = 7.4) at a ratio of 1 mL of solution per 100 mg tissue, and triturated using a homogenizer (PowerGen Model 1000 Homogenizer; Fisher Scientific, Loughborough, UK) to allow proper extraction of inflammatory molecules. After centrifugation at 1000 rpm at 4°C, the supernatant was collected and stored at -80°C for further analysis. Control teeth were extracted and processed in the same way as in the case groups, except for the fact that they underwent a pulpectomy procedure before extraction.

#### Detection of Cytokines and Chemokines

The levels of the cytokines IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, and transforming growth factor beta and the chemokines IL-8/CXCL8, CCL2, CCL3, and CCL5 were evaluated by double-ligand enzyme-linked immunosorbent assay using commercially available kits (R&D Systems, Minneapolis, MN) according to the manufacturer's instructions. In brief, each cytokine was detected by an anticytokine horseradish peroxidase-labeled monoclonal antibody. The o-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) peroxidase substrate kit was used to determine the amount of horseradish peroxidase bound to each well. The reaction was stopped by the addition of 1 mol/L sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). The plates were read at 492 nm, and a standard curve was prepared for each assay. IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), and IL-17A detection was performed using the Human Th1/Th2/Th17 Cytometric Bead Array Kit (BD Biosciences, San Jose, CA) following the manufacturer's instructions. Acquisition was performed with a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences). The instrument has been checked for sensitivity and overall performance with Cytometer Setup and Tracking beads (BD Biosciences) before data acquisition. Quantitative results were generated using FCAP Array v1.0.1 software (Soft Flow Inc, Pecs, Hungary). The results were expressed as picograms of cytokine/100 mg tissue.



**Figure 1.** (A) The radiographic aspect of IERR: bowl-shaped radiolucency in the root surface and adjacent bone (red arrows). (B) Radiographic diagnosis of RERR: bone structures in the resorption area and loss of the periodontal space (black arrows). (C) Sample distribution according to root resorption index in the IERR ( $n = 22$ ) and RERR ( $n = 20$ ) groups.

## Clinical Research

### Statistical Analysis

The Mann-Whitney test was used to compare the IERR and RERR groups regarding the median survival time after replantation and patients' age at the time of extraction. A comparison of the index of root resorption in IERR and RERR cases was performed by means of the chi-square test. Inter- and intrarater agreement values for the assessment of type and index of ERR were estimated using the kappa statistic. A generalized estimation equation with a compound symmetry correlation matrix was used in order to take into account potential correlations in patients with more than 1 tooth (20). The mean log-transformed concentrations of each one of the studied cytokines and chemokines were compared in the RERR and IERR groups. Variables that presented a significance level (*P* value) less than .20 in the univariate analysis were corrected by patients' age at the moment of extraction, index of ERR, and survival time after replantation in a multivariate regression model. In addition, the presence of a statistical interaction was also assessed including a multiplicative interaction term for those variables that were nominally significant. Statistical analysis was performed using the software R (Version 3.0.3; R Core Team, Vienna, Austria). The level of significance was set at *P* < .05.

### Results

The IERR group was composed of 22 teeth, and 20 were classified as RRER. The kappa scores indicated excellent intraexaminer agreement (0.85% and 0.82%) and fair to good interexaminer agreement (0.75%). The mean patients' age at the time of extraction was 13.7 years ( $\pm 3.21$ ) for the IERR group, 15.7 ( $\pm 3.96$ ) for the RRER group, and 13.4 ( $\pm 0.7$ ) for the control group; this difference was not significant (*P* > .05). The median survival time after replantation did not differ between the 2 groups; it was 2.3 years (range, 8.9 months–5.6 years) for the IERR group and 3.5 years (range, 1.3–8.5 years) for the RERR group (*P* > .05). Indices ranged from 5 to 12 and were grouped into 2 categories: moderate (>5 and  $\leq 8$ ) and severe (>9). Sample distribution according to the extension of ERR differed significantly between the 2 groups (*P* < .05) because most of the IERR cases showed advanced stages of root resorption, whereas the RERR cases were distributed almost equally (Fig. 1C).

Data regarding Th1/Th2/Th17 cytokine and chemokine expression in the case (IERR and RERR) and control groups showed that the case

groups (IERR and RERR) showed higher levels of almost all studied factors when compared with the control group without resorption. Such a difference was significant, except for IL-10 and the chemokines CCL2 and CCL3. CCL5 levels were also not significantly different when compared among IERR cases and the control group (Supplemental Figures S1–S3 are available online at [www.jendodon.com](http://www.jendodon.com)).

Results from the univariate analysis comparing the mean log-transformed concentration of studied factors in the IERR and RERR groups as well as the effect of patients' age at the time of extraction, index of ERR, and survival time after replantation are presented in Table 1. The comparison between the IERR and RERR groups revealed higher levels of TNF- $\alpha$  in the IERR group when compared with the RRER cases (Fig. 2A), even after performing a multivariate regression model (*P* < .05) (Table 2). IL-1 $\beta$  levels were marginally lower in the moderate cases of the RERR group (Fig. 2B). Neither the type nor the index of ERR reached a significant effect in the IL-1 $\beta$  levels nor did their interaction term after the multivariate analysis (Table 2).

IL-1Ra levels were nominally affected by the extension but not by the type of root resorption (Fig. 2C and Table 1). The multivariate model, including the index and type of ERR, together with a multiplicative interaction term between these variables disclosed that IL-1Ra levels actually differed in IERR and RERR depending on the index of root resorption. Moderate cases of RERR showed lower IL-1Ra levels than the IERR group. Contrariwise, in advanced stages, the IL-1Ra concentration was higher in the RERR group compared with the IERR group (*P* < .05) (Table 2 and Fig. 2D).

IL-6 (Fig. 2E) and IFN- $\gamma$  (Fig. 2F) showed divergent profiles according to the type of ERR although they did not reach statistical significance. The expression of IL-17A was quite similar in the 2 groups (Supplemental Figures S1–S3 are available online at [www.jendodon.com](http://www.jendodon.com)).

The IERR and RERR groups did not differ regarding the expression of Th2 cytokines except for IL-4 (Fig. 3A), which was also nominally associated with the patients' age at the time of extraction and survival time after replantation (Table 1). A multivariate linear regression model was used to adjust for possible confounding effects between these variables, and the final model showed that IL-4 concentration differed between the IERR and RERR groups in an age-dependent way because there was a significant interaction between these 2 variables (Table 2).

**TABLE 1.** Generalized Estimated Equation Linear Regression Model: Univariate Analysis of the Effect of Patients' Age at the Time of Extraction, Type, and Extension of External Root Resorption and Survival Time after Replantation in the Levels\* of Cytokines and Chemokines in the Periradicular Tissues of Permanent Replanted Teeth

| Cytokine      | Regression coefficient ( $\beta$ ) $\pm$ standard error <sup>†</sup> nominal <i>P</i> value |  |   |   |
|---------------|---|--|---|---|
|               | Patients' age   | RERR $\times$ IERR                                   | Index of root resorption                            | Survival time after replantation                      |
| IL-1 $\beta$  | -0.032 $\pm$ 0.076 <i>P</i> = .677  | -0.847 $\pm$ 0.537 <i>P</i> = .115                   | 0.853 $\pm$ 0.599 <i>P</i> = .155                   | -0.012 $\pm$ -0.196 <i>P</i> = .952                   |
| IL-1Ra        | -0.017 $\pm$ 0.044 <i>P</i> = .697  | -0.299 $\pm$ 0.430 <i>P</i> = .486                   | <b>1.082 <math>\pm</math> 0.436 <i>P</i> = .013</b> | 0.012 $\pm$ -0.126 <i>P</i> = .924                    |
| IL-2          | -0.032 $\pm$ 0.026 <i>P</i> = .225  | -0.113 $\pm$ 0.278 <i>P</i> = .684                   | 0.137 $\pm$ 0.320 <i>P</i> = .668                   | -0.055 $\pm$ -0.081 <i>P</i> = .361                   |
| IL-4          | <b>-0.044 <math>\pm</math> 0.021 <i>P</i> = .037<sup>‡</sup></b>                            | <b>-0.481 <math>\pm</math> 0.211 <i>P</i> = .023</b> | 0.224 $\pm$ 0.217 <i>P</i> = .302                   | <b>-0.093 <math>\pm</math> -0.044 <i>P</i> = .034</b> |
| IL-6          | 0.010 $\pm$ 0.061 <i>P</i> = .872   | -0.028 $\pm$ 0.497 <i>P</i> = .956                   | 0.145 $\pm$ 0.583 <i>P</i> = .788                   | 0.129 $\pm$ -0.127 <i>P</i> = .307                    |
| IL-10         | -0.010 $\pm$ 0.014 <i>P</i> = .463  | -0.061 $\pm$ 0.118 <i>P</i> = .604                   | 0.009 $\pm$ 0.126 <i>P</i> = .943                   | -0.029 $\pm$ -0.028 <i>P</i> = .303                   |
| IL-17a        | -0.002 $\pm$ 0.024 <i>P</i> = .947  | -0.207 $\pm$ 0.221 <i>P</i> = .348                   | 0.145 $\pm$ 0.266 <i>P</i> = .585                   | -0.020 $\pm$ -0.031 <i>P</i> = .522                   |
| IFN- $\gamma$ | -0.001 $\pm$ 0.018 <i>P</i> = .950  | 0.095 $\pm$ 0.166 <i>P</i> = .566                    | -0.050 $\pm$ 0.171 <i>P</i> = .773                  | -0.012 $\pm$ -0.030 <i>P</i> = .679                   |
| TNF- $\alpha$ | -0.018 $\pm$ 0.020 <i>P</i> = .349  | <b>-0.324 <math>\pm</math> 0.155 <i>P</i> = .036</b> | 0.112 $\pm$ 0.179 <i>P</i> = .530                   | -0.049 $\pm$ -0.038 <i>P</i> = .198                   |
| TGF- $\beta$  | -0.038 $\pm$ 0.052 <i>P</i> = .459  | 0.183 $\pm$ 0.403 <i>P</i> = .650                    | -0.068 $\pm$ 0.389 <i>P</i> = .862                  | -0.093 $\pm$ -0.087 <i>P</i> = .283                   |
| IL-8 (CXCL8)  | -0.049 $\pm$ 0.076 <i>P</i> = .517  | -0.406 $\pm$ 0.553 <i>P</i> = .463                   | 0.421 $\pm$ 0.621 <i>P</i> = .498                   | 0.037 $\pm$ -0.164 <i>P</i> = .820                    |
| CCL2          | <b>-0.024 <math>\pm</math> 0.009 <i>P</i> = .008</b>  | -0.030 $\pm$ 0.103 <i>P</i> = .769                   | -0.058 $\pm$ 0.107 <i>P</i> = .588                  | -0.018 $\pm$ -0.184 <i>P</i> = .333                   |
| CCL3          | -0.022 $\pm$ 0.030 <i>P</i> = .462  | -0.179 $\pm$ 0.369 <i>P</i> = .628                   | -0.101 $\pm$ 0.363 <i>P</i> = .777                  | 0.094 $\pm$ -0.081 <i>P</i> = .245                    |
| CCL5          | 0.035 $\pm$ 0.042 <i>P</i> = .404   | 0.647 $\pm$ 0.502 <i>P</i> = .197                    | -0.295 $\pm$ 0.398 <i>P</i> = .459                  | 0.098 $\pm$ -0.107 <i>P</i> = .363                    |

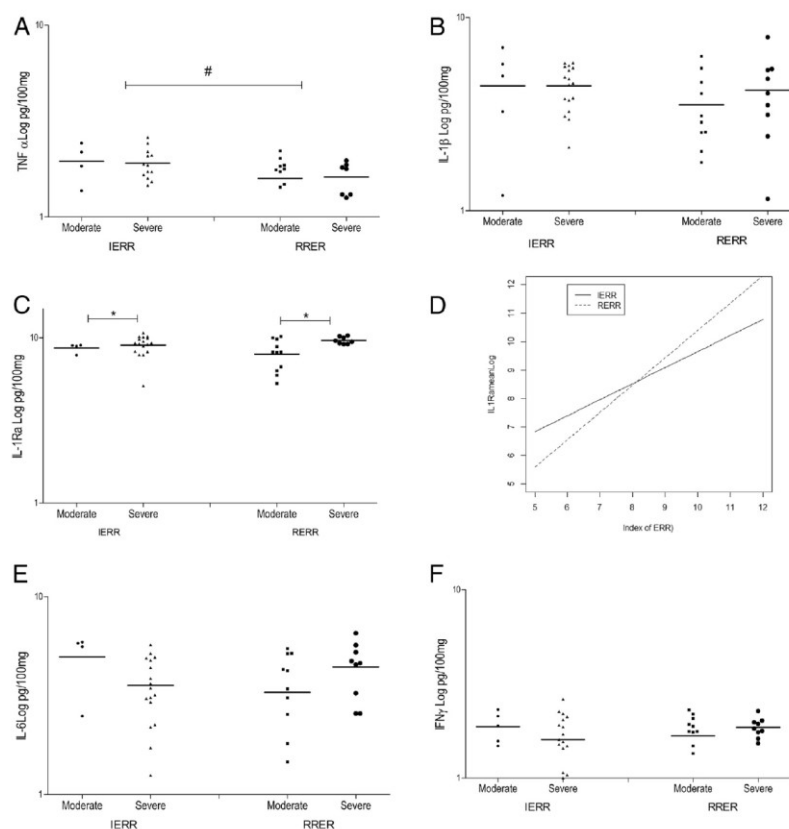
IFN- $\gamma$ , interferon gamma; IL, interleukin; TGF- $\beta$ , transforming growth factor beta; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha.

\*Log transformed.

<sup>†</sup>Regression coefficient ( $\beta$ ) represents slope estimate  $\pm$  standard error of the estimate (S.E.). Positive and negative regression coefficients indicate the dependence of cytokine levels on the determinant variables.

<sup>‡</sup>Bold values indicate a nominal *P* value less than .20

## Clinical Research



**Figure 2.** (A) TNF- $\alpha$  levels were statistically higher in the IERR group when compared with the RERR group even after correction by the index of resorption ( $\#P < .05$ ). (B) IL-1 $\beta$  levels were marginally lower in the moderate cases of the RERR group, but this difference was not statistically significant ( $P > .05$ ). (C) The IL-1Ra concentration increased significantly in advanced stages of both the IERR and RERR groups ( $*P < .05$ ). (D) The significant interaction between the type and index of ERR ( $P < .05$ ) revealed that the increase of IL-1Ra levels was more intense in severe cases of RERR. (E) IL-6 expression diminished in advanced stages of IERR and increased in advanced stages of RERR, but this difference was not significant ( $P > .05$ ). (F) INF- $\gamma$  expression also showed divergent profiles according to the type of ERR although not reaching statistical significance ( $P > .05$ ).

Although IL-4 levels were not affected by age in the IERR group, IL-4 changed with the increase of the patients' age at the moment of extraction in the RERR group ( $P < .05$ ) (Fig. 3B). IL-2, IL-10, and transforming growth factor beta showed profiles that were indistinguishable for the 2 groups (Supplemental Figures S1–S3 are available online at [www.jendodon.com](http://www.jendodon.com)).

The concentration of the studied chemokines CCL2, CCL3, CCL5, and IL-8/CXCL8 were not affected by the type nor the index of root resorption (Table 1) (Supplemental Figures S1–S3 are available online at [www.jendodon.com](http://www.jendodon.com)). However, CCL2 levels diminished significantly with the increase of patients' age at the moment of extraction irrespective of the type of ERR (Fig. 4A and B).

### Discussion

Replantation is widely accepted as a therapeutic measure for avulsed permanent teeth although its long-term prognosis is controversial because of the occurrence of ERR (1). Tooth resorption is believed

to be very similar to bone resorption, also involving an elaborate interaction among stromal and immune cells mediated by soluble factors such as cytokines, chemokines, and growth factors (7). However, information on the biological mechanisms of root resorption in human subjects is still scanty; most of it concerns EARR associated with orthodontics and root resorption of primary teeth. The present study originally described the inflammatory profile of the periradicular tissues of extracted human teeth showing progressive IERR and RERR after replantation. As far as we are concerned, there are no clinical data in the literature regarding this issue since the pioneer studies from Andreasen and Hjørting-Hansen (21, 22), who defined and histologically described these 2 entities. The overall scenario observed in the IERR and RERR groups showed higher levels of almost all studied factors when compared with the control group without resorption. These results corroborate the finding that ERR shares similar molecular biologic events with bone resorption (7).

Moreover, the comparison between the case groups revealed different immunologic profiles in IERR and RERR, endorsing their

## Clinical Research

**TABLE 2.** A Final Multivariate Model Showing the Relationship of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1Ra (IL-1Ra), IL-4, and CCL2 Levels\* and Type and Extension of External Root Resorption (ERR), Patients' Age at Time of Extraction, and Survival Time after Replantation

| Cytokine/chemokine | Variables  | Regression coefficient ( $\beta$ ) $\pm$ standard error <sup>†</sup> | P value |
|--------------------|--|--|---------|
| TNF- $\alpha$      | Type of ERR                                      | Reference  |         |
|                    | IERR   | -0.306 $\pm$ 0.156   | .050    |
|                    | RERR   | -0.021 $\pm$ 0.038   | .580    |
| IL-1Ra             | Survival time                                    |  |         |
|                    | Type of ERR                                      | Reference  |         |
|                    | IERR   | 0.141 $\pm$ 0.325  | .055    |
|                    | RERR   | 1.139 $\pm$ 0.375  | .374    |
| IL-4               | Index of ERR                                     | 1.345 $\pm$ 0.646  | .038    |
|                    | Type of ERR $\times$ index of ERR                |  |         |
|                    | Type of ERR                                      | Reference  |         |
|                    | IERR   | -0.401 $\pm$ 0.234   | .024    |
| CCL2               | RERR   | -0.022 $\pm$ 0.022   | .032    |
|                    | Patient's age at extraction                      | 0.098 $\pm$ 0.050  | .047    |
|                    | Type of ERR $\times$ patients' age at extraction |  |         |
|                    | Type of ERR                                      | Reference  |         |
| CCL2               | IERR   | 0.001 $\pm$ 0.092  | .995    |
|                    | RERR   | -0.027 $\pm$ 0.012   | .019    |
|                    | Patient's age at extraction                      |  |         |
|                    | Type of ERR $\times$ patients' age at extraction |  |         |

IERR, inflammatory external root resorption; RERR, replacement external root resorption.

\*Log transformed.

<sup>†</sup>Regression coefficient ( $\beta$ ) represents slope estimate  $\pm$  standard error of the estimate. Positive and negative regression coefficients indicate the dependence of cytokine levels on the determinant variables.

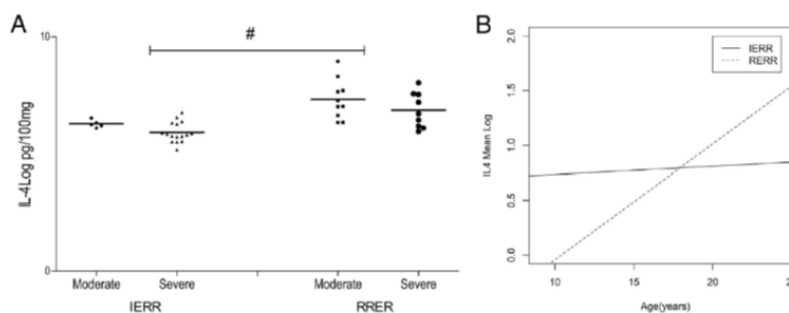
distinct pathobiology. The higher levels of IL-4 in older patients within the RERR group are consistent with the fact that RERR results from the incorporation of the tooth root during physiological alveolar bone turnover (6). IL-4 has an inhibitory effect in osteoclast formation and activity and is considered an antiresorptive cytokine (23). IL-4 inhibited IL-1-stimulated bone resorption by decreasing the production of prostaglandins and the activity of cyclooxygenase-2 (8). IL-4 has also influenced osteoblasts to increase osteoprotegerin and inhibit receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand production (8). Therefore, it can be assumed that IL-4 may also exert the same regulatory effect over

RERR. The higher levels of IL-4 associated with age can be explained by the lower rate of RERR in older patients reported in clinical studies (18). Experimental results also showed that IL-4 reduced EARR after orthodontics (24, 25). On the other hand, IL-4 levels did not vary in the IERR group. Considering that the etiopathogenesis of IERR has similarity to periapical lesions of endodontic origin, such a finding is in agreement with previous reports showing that IL-4 has a minor role in suppressing infection-stimulated periapical bone resorption *in vivo* (26, 27).

The IERR group presented higher levels of TNF- $\alpha$  when compared with RERR cases. This result is consistent with the microbial etiology of progressive IERR (5, 6) and the presence of an inflammatory infiltrate described in the periodontal tissue of teeth showing IERR (21). TNF- $\alpha$  is a proresorptive cytokine, especially in response to infection, contributing to the differentiation, chemotaxis, and activation of clasts and their precursors (28). The role of TNF- $\alpha$  in tooth resorption was demonstrated experimentally *in vivo* in mechanically induced root resorption in rats (11) and after replantation of rat teeth (12). Additionally, *in vitro* studies also showed that treatment with lipopolysaccharides significantly up-regulated the expression of TNF- $\alpha$  messenger RNA (12). The present results are consistent with the findings of previous experimental and human research showing high levels of TNF- $\alpha$  in periapical lesions of endodontic origin (29). Bone destruction in periapical lesions is an indirect effect of bacteria and their by-products, leading to the secretion of proinflammatory cytokines, such as IL-1, TNF- $\alpha$ , and IL-6, by several inflammatory cells (30, 31).

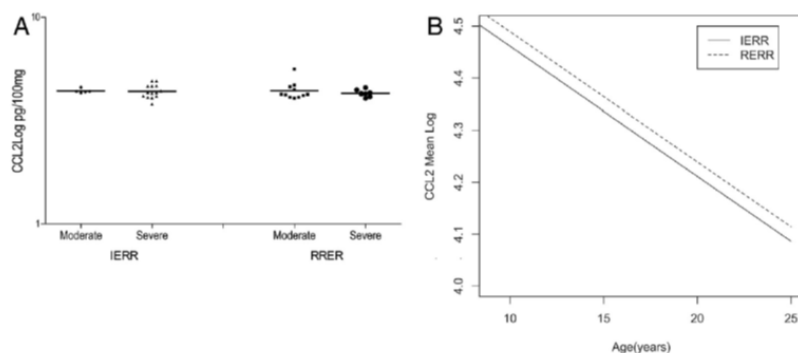
The raw data showed that IL-1 $\beta$  levels were higher in the IERR group, especially in moderate stages. Interestingly, these results did not reach statistical significance, even after testing for the effect of the interaction between the index and type of ERR. This is disappointing considering the well-known role of IL-1 $\beta$  in mediating bone resorption of an endodontic infectious origin (29). One explanation could be the relatively small number of moderate cases of IERR and the wide range of IL-1 $\beta$  concentrations in both groups.

IL-1Ra levels differed significantly in the IERR and RERR groups depending on the index of ERR because they were higher in the IERR group for moderate cases but increased in the RERR group in severe cases. The important feature behind this result is the fact that such a difference could only be disclosed after testing these 2 variables for their interaction. A significant interaction indicates that the effect of one factor depends on the levels of another. In theory, a comparison of the effects of different variables requires a statistical test on their difference that



**Figure 3.** (A) The IL-4 concentration differed significantly between the IERR and RERR groups ( $\#P < .05$ ). (B) The positive interaction between patients' age and type of ERR ( $P < .05$ ) revealed that IL-4 levels became higher with the increase of the patients' age at the time of extraction in RERR cases but was not affected by patients' age in the IERR group.

## Clinical Research



**Figure 4.** (A) CCL2 levels were not influenced by the type ( $P > .05$ ) or the index of root resorption ( $P > .05$ ). (B) CCL2 levels diminished significantly with the increase of patients' age at extraction irrespective of the type of root resorption ( $P < .05$ ).

should be performed interpreting the  $P$  value of the interaction term first. If this  $P$  value is not significant, then the main effects could be examined separately (ie, in an additive fashion). This procedure not only permits simultaneously investigating the association of a number of different variables with a given response but also allows testing for the associations between them. The observation of higher levels of IL-1Ra in moderate stages of IERR is consistent with clinical reports of higher concentrations of IL-1Ra in periapical exudate samples (32) and extracts of inflammatory periapical tissues (33). IL-1Ra is an important inhibitor of IL-1, having an indirect antiresorptive effect by binding competitively to the receptor IL-1RI, with near similar avidity but without inducing signal transduction (34). The paradoxical behavior of IL-1Ra in the IERR and RERR groups has no parallel in the literature. Taken together with the contradictory behavior of IL-6 and IFN- $\gamma$ , these results can be discussed based on experimental findings showing that some cytokines may possess dual osteoclastogenic and antiosteoclastogenic properties depending on the specific pathophysiological condition in which they are being studied *in vivo* or on the developmental stage of osteoclasts in *in vitro* experiments (23).

Levels of the chemokines CCL2, CCL3, CCL5, and IL8/CXCL8 were quite similar in the IERR and RERR cases. Also, CCL2 and CCL3 concentrations did not differ between the resorption and control groups. These are intriguing results and could be attributed to the cross-sectional design of the study. IL-8/CXCL8 levels were significantly higher in the resorption cases when compared with the control group, suggesting that IL-8/CXCL8 may have an active role in both types of ERR. These results are coherent with their crucial role described in inflammation and bone metabolism (13, 14). CCL2 concentrations decreased significantly in older patients irrespective of the type of ERR. This finding has no explanation in the literature and demands further investigation.

The present study has strengths and limitations. The major question is related to the cross-sectional design of the study, having individual cytokine concentration, at 1 point in time, as the outcome. This may be partially informative or even misleading and precludes drawing inferences on the casual relationships and dynamics of interactions among the signaling cytokines that are of central importance. In addition, teeth with different survival times after replantation were gathered in the IERR and RERR groups. Considering that the resorption process is characterized by active phases followed by intermittent periods of rest (35), the present results might have failed to detect such differences. A longitudinal study, with established cutoff periods of follow-up, would allow the evaluation of cytokine fluctuation along the ERR process. Moreover, conducting

controlled experiments on human samples is often impractical because cytokine responses among individuals having different backgrounds will vary, causing a spread in the data. Therefore, even with enzyme-linked immunosorbent assay and Cytometric Bead Array methods being shown to produce consistent results in several oral conditions, additional confirmation of the present results with a second technique would be desirable. Nonetheless, considering the exclusion of major confounding factors, the appropriate statistical approach adopted, and the significant cytokines detected (which correlates well with the literature), our data can still be regarded as valid and reliable. Despite the previously mentioned limitations, the present study provided some interesting insights into the biological mechanisms of ERR.

In conclusion, our results suggest differences in the immunologic profile of IERR and RERR that may be relevant to understanding the biological mechanisms underlying the different patterns of ERR. Considering that replantation still represents the treatment of choice for avulsed permanent teeth in children and teenagers, such knowledge is very important. This is the first step to developing new approaches directed to manipulate clastic activity, a key point to maintaining an avulsed tooth for as long as it is needed, even when replanted under unsuitable conditions.

### Acknowledgments

Supported by the following Brazilian funding agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento da Ciencia e Tecnologia (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), and Pro-Reitoria de Extensao-Universidade Federal de Minas Gerais (PROEx-UFMG).

The authors deny any conflict of interests related to this study.

### Supplementary Material

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at [www.jendodon.com \(http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2016.10.018\)](http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2016.10.018).

### References

- Andreasen JO, Andreasen FM. Avulsions. In: Andreasen JO, Andreasen FM, Andersson L, eds. *Textbook and Color Atlas of Traumatic Injuries to Teeth*, 4th ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2007:444-88.
- Andreasen J, Andreasen F. Root resorption following traumatic dental injuries. *Proc Finn Dent Soc* 1992;88(Suppl 1):95-114.

## Clinical Research

3. Hammarström L, Pierce A, Blomlöf L, et al. Tooth avulsion and replantation - a review. *Endod Dent Traumatol* 1986;2:1-8.
4. Trope M, Yesilsoy C, Koren L, et al. Effect of different endodontic treatment protocol on periodontal repair and root resorption of replanted teeth. *J Endod* 1992;18:492-6.
5. Hincfuss SE, Messer LB. An evidence-based assessment of the clinical guidelines for replanted avulsed teeth. Part I: timing of pulp extirpation. *Dent Traumatol* 2009;25:32-42.
6. Hammarström L, Blomlöf L, Lindskog S. Dynamics of dentoalveolar ankylosis and associated root resorption. *Endod Dent Traumatol* 1989;5:163-75.
7. Sasaki T. Differentiation and functions of osteoclasts and odontoclasts in mineralized tissue resorption. *Microsc Res Tech* 2003;61:483-95.
8. Lee S, Kim TS, Choi Y, Lorenzo J. Osteoimmunology: cytokines and the skeletal system. *BMB Rep* 2008;41:495-510.
9. Harokopakis-Hajishengallis E. Physiologic root resorption in primary teeth molecular and histological events. *J Oral Sci* 2007;49:1-12.
10. Tyrovolas JB, Spyropoulos MN, Makou M, et al. Root resorption and the OPG/RANKL/RANK system: a mini review. *J Oral Sci* 2008;50:367-76.
11. Zhang D, Goetz W, Braumann B, et al. Effect of soluble receptors to interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha on experimentally induced root resorption in rats. *J Periodontol Res* 2003;38:324-32.
12. Rego EB, Inubushi T, Miyauchi M, et al. Ultrasound stimulation attenuates root resorption of rat replanted molars and impairs tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling *in vitro*. *J Periodontol Res* 2011;46:648-54.
13. Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, et al. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res* 2007;86:306-19.
14. Yadav A, Saini V, Arora S. MCP-1: Chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin Chim Acta* 2010;411:21-2.
15. Silva TA, Rosa AL, Lara VS. Dentin matrix proteins and soluble factors: intrinsic regulatory signals for healing and resorption of dental and periodontal tissues? *Oral Dis* 2004;10:63-74.
16. Cao J. Up regulated expression of monocyte chemoattractant protein-1 in human periodontal ligament cells induced by interleukin-1 $\beta$ . *Aust Dent J* 2015;60:382-9.
17. Bastos JV, Cortes MIS, Andrade Goulart EM, et al. Age and timing of pulp extirpation as major factors associated with inflammatory root resorption in replanted permanent teeth. *J Endod* 2014;40:366-71.
18. Andersson L, Bodin I, Sörensen S. Progression of root resorption following replantation of human teeth after extended extraoral storage. *Endod Dent Traumatol* 1989; 5:38-47.
19. Andreassen JO, Borum M, Jacobsen H, et al. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. I - Diagnosis of healing complications. *Endod Dent Traumatol* 1995;11:51-8.
20. Diggle P, Hegerty P, Liang K, Zeger S. *Analysis of longitudinal data*, 2nd ed. Oxford, UK: Oxford University Press; 2002.
21. Andreassen JO, Hjørting-Hansen E. Replantation of teeth. I. Radiographic and clinical study of 110 human teeth replanted after accidental loss. *Acta Odontol Scand* 1966; 24:263-86.
22. Andreassen JO, Hjørting-Hansen E. Replantation of teeth. II. Histological study of 22 replanted anterior teeth in humans. *Acta Odontol Scand* 1966;24:287-306.
23. Zupan J, Jeras M, Marc J. Osteoimmunology and the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts. *Biochem Med (Zagreb)* 2013;23:43-63.
24. Halkami Z, Kitaura H, Kimura K, et al. Effect of interleukin-4 on orthodontic tooth movement and associated root resorption. *Eur J Orthod* 2015;37:87-94.
25. He D, Kou X, Luo Q, et al. Enhanced M1/M2 macrophage ratio promotes orthodontic root resorption. *J Dent Res* 2015;94:129-39.
26. Sasaki H, Hou L, Belani A, et al. IL-10, but not IL-4, suppresses infection-stimulated bone resorption *in vivo*. *J Immunol* 2000;165:3626-30.
27. De Rossi A, Rocha LB, Rossi MA. Interferon-gamma, interleukin-10, Interleukin adhesion molecule-1, and chemokine receptor 5, but not interleukin-4, attenuate the development of periapical lesions. *J Endod* 2008;34:313-8.
28. Boyce BF, Li P, Yao Z, et al. TNF-alpha and pathologic bone resorption. *Keio J Med* 2005;54:127-31.
29. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol* 2011;17:3.
30. Fouad AF. IL-1 alpha and TNF-alpha expression in early periapical lesions of normal and immunodeficient mice. *J Dent Res* 1997;76:1548-54.
31. Tani-Ishii N, Wang CY, Stashenko P. Immunolocalization of bone-resorptive cytokines in rat pulp and periapical lesions following surgical pulp exposure. *Oral Microbiol Immunol* 1995;10:215-9.
32. Shimauchi H, Takayama S, Imai-Tanaka T, et al. Balance of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist in human periapical lesions. *J Endod* 1998;24: 116-9.
33. Danin J, Linder L, Lundqvist G, et al. Cytokines in periradicular lesions: the effect of linezolid treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;96: 492-8.
34. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* 2013;39:1003-18.
35. Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19:444-51.

## ANEXO 4

## Produção científica durante o curso (Artigo publicado 02)

## ARTICLE IN PRESS

## CLINICAL RESEARCH

# Survival of Replanted Permanent Teeth after Traumatic Avulsion

## ABSTRACT

**Introduction:** Tooth replantation is the treatment of choice for avulsion, even though its long-term prognosis shows great variability and few studies have adopted survival analysis to evaluate the fate of such teeth. The present study aimed to evaluate both the survival rate of replanted permanent teeth after traumatic avulsion as well as its clinical and demographic determinants. **Methods:** Records from 576 patients treated at the Dental Trauma Clinic at the Federal University of Minas Gerais, Brazil, were analyzed to collect clinical and radiographic data. Kaplan-Meier curves and a multivariate Cox regression model were used to estimate the probability of replanted teeth remaining functional in the mouth and to determine prognostic factors. **Results:** The post-replantation survival rate was 50% after 5.5 years. Immature teeth presented an increase of 51.3% in the loss rate ( $P = .002$ ). Each additional year in the patient's age at the time of trauma, up to the limit of 16 years, reduced the loss rate of replanted teeth by 15% ( $P < .001$ ). The storage of the avulsed teeth in milk decreased the loss rate of replanted teeth by 56.4% ( $P = .015$ ) when compared with those kept dry. **Conclusions:** The overall survival rate after replantation of permanent teeth was 50% after 5.5 years. Advanced stages of root development, together with the increase in the patient's age at the moment of trauma, up to the limit of 16 years, were good prognostic factors for tooth survival. The storage of avulsed teeth in milk was also associated with enhanced tooth survival after replantation. (*J Endod* 2019; ■:1–6.)

## KEY WORDS

Milk; storage medium; survival analysis; tooth avulsion; tooth replantation

Tooth avulsion is a serious traumatic dental injury (TDI), with prevalence in permanent dentition ranging from 0.5%–16.0%<sup>1,2</sup>. Replantation of avulsed permanent teeth is still the desirable treatment option, especially in growing patients. However, the long-term prognosis shows great variability because it is affected by several factors related to the immediate management of the avulsed tooth as well as to the emergency and sequential treatment<sup>2–5</sup>.

The clinical dental literature regarding the fate of avulsed/replanted teeth is still dominated by isolated case reports and cross-sectional retrospective studies that lack standardization of evaluated outcomes as well as of statistical treatment of the data. In addition, most longitudinal clinical studies have evaluated the role of clinical and demographic determinants in different periodontal healing patterns that cannot necessarily be translated into replantation success/failure rates. This fact makes comparisons of results, data pooling, and overall conclusions very difficult<sup>6</sup>. To overcome these shortcomings, survival analysis has been suggested as the ideal approach for replantation studies because it allows inclusion of patients with different follow-up times<sup>7</sup>. Few studies have adopted this methodology to evaluate the long-term prognosis of replanted teeth. Andreassen et al<sup>8</sup> conducted the first prospective study with 400 replanted permanent teeth that were followed for a mean period of 5.1 years. There was an overall tooth loss rate of 30%, which was significantly higher for teeth with incomplete root development (55%) when compared with mature teeth (45%)<sup>8</sup>. Barrett and Kenny<sup>9</sup> reported a frequency of tooth loss of 25% in a sample comprising 52 replanted teeth. The relative risk of failure was significantly greater for immature teeth, in patients younger than 11 years, and for those who required prolonged calcium hydroxide therapy. Pohl et al<sup>10</sup> reported an estimated survival of 4.7 years in a sample of 28 teeth replanted after extraoral endodontic treatment and retrograde insertion of posts. Tooth loss/extraction comprised 35% and was associated with storage condition. Differences in the survival expectation were not significant when mature and immature teeth were compared. A total of 31.3% of tooth loss/extraction was observed

Sylvia Cure Coste, MSc,\*  
Eduardo Fernandes e Silva, BS,†  
Letícia Canhestro Machado Santos, BS,† Daniela Augusta Barbato Ferreira, DDS, MSc, PhD,\*  
Maria Ilma de Souza Côrtes, DDS, MSc, PhD,\*  
Enrico Antônio Colosimo, PhD,†  
and Juliana Vilela Bastos, DDS, MSc, PhD\*

## SIGNIFICANCE

A survival rate of 50% after 5.5 years for replanted permanent teeth was demonstrated. Stage of root development was an important prognostic factor. Original clinical evidence of milk as a favorable storage medium for avulsed tooth was also provided.

From the \*Dental Trauma Program, Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, and †Department of Statistics-Institute of Exact Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais; and ‡Department of Dentistry, Pontifical University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

The authors deny any conflicts of interest related to this study.

Address requests for reprints to Dr Juliana Vilela Bastos, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Campus Pampulha, Av. Presidente Antônio Carlos 6627, 31270901, Belo Horizonte, Brazil.  
E-mail address: jvb@ufmg.br  
0099-2399/\$ - see front matter

Copyright © 2019 Published by Elsevier Inc. on behalf of American Association of Endodontists.  
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2019.11.013>

## ARTICLE IN PRESS

by Petrovic et al<sup>11</sup> in a sample comprising 32 replanted teeth, with a median survival period of 2.5 years. The stage of root development at the time of replantation was the only variable that affected tooth survival. In a study by Wang et al<sup>12</sup>, a sample of 196 teeth was followed for a mean period of 4 years. A total of 46 teeth (23.5%) were lost/extracted by the end of the study; most of them were immature teeth. The median survival period for each group was given graphically, and as could be estimated from the pictures, the periods were 5.5 years for immature teeth and 11 years for mature teeth.

The present study aimed to conduct a survival analysis of replanted permanent teeth and determine their clinical and demographic prognostic factors, among patients treated at the Dental Trauma Clinic in the School of Dentistry, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

## MATERIALS AND METHODS

The present sample comprised avulsed and replanted permanent teeth from patients treated in the Dental Trauma Program at the Federal University of Minas Gerais in Belo Horizonte, Brazil from 1994–2018. Emergency care was provided at the Metropolitan Hospital Odilon Behrens. Thereafter, patients were referred to the Dental Trauma Clinic in the School of Dentistry UFMG, where they underwent sequential treatment and follow-up. Both centers participate in the multidisciplinary Dental Trauma Program at UFMG and in 1994 adopted the same protocol to manage TDIs<sup>13</sup>. Replantation steps were the following: the avulsed tooth was kept in Hanks' balanced salt solution, and the socket was copiously irrigated with saline. The tooth was then held by the crown, avoiding any manipulation of the root surface, and gently repositioned by using light digital pressure on the buccal and palatal sides of the alveolar process. After tooth repositioning, a radiograph was taken to verify the position, and the tooth was splinted with orthodontic wire (Ø 0.8 mm) and composite resin. Root development was evaluated from periapical radiographs taken at the replantation visit and classified according to the stages described by Moorrees et al<sup>14</sup>. Teeth with stages 1–4, corresponding to root length development in quarters, were classified as immature. Teeth showing full root length with the apical foramen half closed were classified as stage 5. Teeth showing full root development with closed apex were classified as stage 6. Pulpotomy and splint removal were performed after a minimum period of 15 days in the Dental Trauma Clinic at UFMG.

**TABLE 1** - Sample Distribution according to Pulpal Status and Stage of Root Development

| Pulpal status           | Stage of root development |           |           |           |             | Total N (%) |
|-------------------------|---------------------------|-----------|-----------|-----------|-------------|-------------|
|                         | 2 n (%)                   | 3 n (%)   | 4 n (%)   | 5 n (%)   | 6 n (%)     |             |
| Pulp survival           | 1 (10)                    | 1 (4.3)   | 2 (4.9)   | 1 (2.7)   | 0           | 5 (0.9)     |
| Pulp canal obliteration | 1 (10)                    | 1 (4.3)   | 0         | 1 (2.7)   | 0           | 3 (0.5)     |
| Pulp bone               | 2 (20)                    | 4 (17.4)  | 4 (9.8)   | 1 (2.7)   | 0           | 11 (1.9)    |
| Necrosis                | 6 (60)                    | 17 (73.9) | 35 (85.4) | 34 (91.9) | 465 (100.0) | 557 (96.7)  |
| Total                   | 10                        | 23        | 41        | 37        | 465         | 576 (100.0) |

After pulpectomy, the root canals of mature teeth received a calcium hydroxide dressing for at least 4 weeks, and then if there were no clinical or radiographic signs of infection, they were filled with gutta-percha and sealer. The patients were examined every 3 months during the first year and annually thereafter. Calcium hydroxide therapy was continued after the first month if there were signs of persistent infection (inflammatory external root resorption- [IERR], fistula, and progressive crown discoloration) or in immature teeth to promote apexification. Periapical radiograph standardization was based on established criteria found in literature described elsewhere<sup>15</sup>. Survival of replanted teeth was defined as the length of time a replanted tooth remained functional after replantation, that is, the tooth remained in the mouth with no signs of infection or infra-positioning with arrested alveolar bone development<sup>16–18</sup>. This evaluation was based on clinical and radiographic evidence found during follow-up. Periodontal healing was radiographically evaluated at the last follow-up visit, assessing the presence and type of external root resorption (ERR). Resorption was classified either as IERR or as replacement ERR [RERR], according to the criteria of Andreasen et al<sup>9</sup>. The extent of ERR was also assessed by using the root resorption index developed by Andersson et al<sup>19</sup>. Pulpal status was classified as pulp necrosis, pulp canal obliteration, pulp bone and pulp survival without radiographic changes, following criteria described by Andreasen et al<sup>9</sup>. Clinical and demographic variables such as patient's age at the time of trauma, stage of root development, extra-alveolar period and storage conditions of the avulsed teeth, systemic antibiotic therapy (SAT) prescription, splinting period, timing of pulpectomy, and definitive obturation of root canal were also retrospectively collected from patients records. Exclusion criteria were concomitant root or alveolar process fractures, replanted tooth with previous events of trauma, extensive restorations, endodontically treated, or with radiographic signs of root resorption before

the injury. Those patients with a second event of trauma occurring during the follow-up period had their data collected up to the event of the second trauma. This study was approved by the Committee on Ethics in Research of the UFMG (COEP-UFMG - 2.756.614).

## Statistical Analysis

Kaplan-Meier curves were used to estimate survival after replantation and to determine the probability of replanted teeth remaining in the oral cavity during the follow-up period. The nonparametric log-rank test was used to compare survival curves for categorical variables (gender, SAT prescription, concomitant crown fractures, tooth group, and stage of root development). Because there were missing data for the covariates SAT prescription, extra-alveolar period, and storage condition, multiple imputation was used via the Multiple Imputation by Chained Equations (MICE) package in R, so that individuals missing that information could be included in the analysis<sup>20</sup>. The Cox proportional hazards model was used to explore nominal associations of continuous factors with risk of loss/extraction. The status of immobilization and endodontic therapy changed during the follow-up period, and they came to be treated as time-dependent covariates. The extra-alveolar period was logarithmically transformed because of its great asymmetry. A spline-based strategy demonstrated that the covariate patient's age at trauma had a non-linear effect. Therefore, it was split into 2 linear

**TABLE 2** - Causes of Tooth Loss/Extraction

|                        | n (%)       |
|------------------------|-------------|
| RERR                   | 32 (22.7)   |
| IERR                   | 21 (14.9)   |
| Infraocclusion         | 38 (27.0)   |
| Cervical root fracture | 27 (19.2)   |
| Others                 | 23 (16.2)   |
| Total                  | 141 (100.0) |

## ARTICLE IN PRESS

**TABLE 3** - Pulpal Status among Censored and Lost/Extracted Teeth

| Pulpal healing          | Lost/extracted<br>n (%) | Censored<br>n (%) | Total<br>N (%) |
|-------------------------|-------------------------|-------------------|----------------|
| Pulp survival           | 0                       | 5 (1.2)           | 5 (0.9)        |
| Pulp canal obliteration | 0                       | 3 (0.7)           | 3 (0.5)        |
| Pulp bone               | 3 (2.1)                 | 8 (1.8)           | 11 (1.9)       |
| Necrosis                | 138 (97.9)              | 419 (96.3)        | 557 (96.7)     |
| Total                   | 141 (100)               | 435 (100)         | 576 (100)      |

components considering the cutoff point of 16 years, according to previous literature<sup>15,19</sup>. Independent variables were entered into the final multivariate Cox model on the basis of their statistical significance in the univariate

analysis ( $P \leq .30$ ). Goodness of fit based on the Schoenfeld residuals test was used to verify the proportional hazards assumption. The level of significance was set at  $P < .05$ . Statistical analysis was performed by using the

**TABLE 4** - Cox Regression Model-Univariate and Multivariate Analysis of Potential Predictors of Tooth Survival after Replantation

| Prognostic factor                  | Univariate analysis                            | Multivariate analysis                               |
|------------------------------------|--|---|
|                                    | HR (95% CI), P                                 |   |
| Gender                             |  |   |
| Female                             | Reference                                      |   |
| Male                               | 0.86 (0.51–1.21), $P = .40$                    |   |
| Patient's age at trauma*           |  |   |
| <16                                | <b>0.87 (0.80–0.94), <math>P = .001</math></b> | <b>0.85 (0.79–0.92), <math>P &lt; .001^*</math></b> |
| $\geq 16$                          | <b>1.12 (1.01–1.22), <math>P = .03</math></b>  | 0.98 (0.92–1.03), $P < .216$                        |
| Systemic antibiotic therapy        |  |   |
| No                                 | Reference                                      |   |
| Yes                                | 0.95 (0.40–1.50), $P = .72$                    |   |
| Concomitant crown fractures        |  |   |
| No                                 | Reference                                      |   |
| Yes                                | 0.88 (0.78–1.63), $P = .50$                    |   |
| Tooth group                        |  |   |
| Central upper incisors             | Reference                                      |   |
| Lateral upper incisors             | 0.81 (0.48–1.37), $P = .72$                    |   |
| Mandibular incisors                | 0.58 (0.19–1.72), $P = .32$                    |   |
| Extra-alveolar period              |  |   |
| Each additional day                | <b>1.13 (0.97–1.30), <math>P = .09</math></b>  |   |
| Stage of root development          |  |   |
| Incomplete                         | Reference                                      |   |
| Complete                           | <b>0.58 (0.39–0.87), <math>P = .008</math></b> | <b>0.513 (0.34–0.38), <math>P = .002^†</math></b>   |
| Storage condition                  |  |   |
| Dry                                | Reference                                      | Reference   |
| Water                              | 0.88 (0.36–1.40), $P = .62$                    | 0.79 (0.46–1.35), $P = .387$                        |
| Saline                             | 0.85 (0.35–1.35), $P = .52$                    | 0.85 (0.52–1.40), $P = .518$                        |
| Saliva                             | <b>0.58 (0.08–1.07), <math>P = .28</math></b>  | 0.5 (0.17–1.46), $P = .203$                         |
| Milk                               | <b>0.63 (0.18–1.06), <math>P = .05</math></b>  | <b>0.56 (0.25–0.89), <math>P = .015^†</math></b>    |
| Timing of endodontic therapy steps |  |   |
| None (pulpal healing)              | Reference                                      |   |
| Time until pulpectomy              | 1.52 (0.36–6.43), $P = .56$                    |   |
| Timing of CaOH dressing            | 2.11 (0.67–6.64), $P = .20$                    |   |
| Timing after obturation            | 0.52 (0.14–1.96), $P = .33$                    |   |
| Splinting                          |  |   |
| None                               | Reference                                      |   |
| Timing with splint                 | 0.21 (0.002–1.45), $P = .14$                   |   |
| Time without splint                | 0.38 (0.003–6.26), $P = .42$                   |   |

\*Multivariate model including 2 linear components for the continuous covariate patient's age at trauma, extra-alveolar period and storage condition.

†Multivariate model including stage of root development, extra-alveolar period and storage condition.

Covariates that entered the multivariate model and remained significant in the final multivariate model are indicated in bold.

R software (version 3.5.3; Vienna, Austria, 2018).

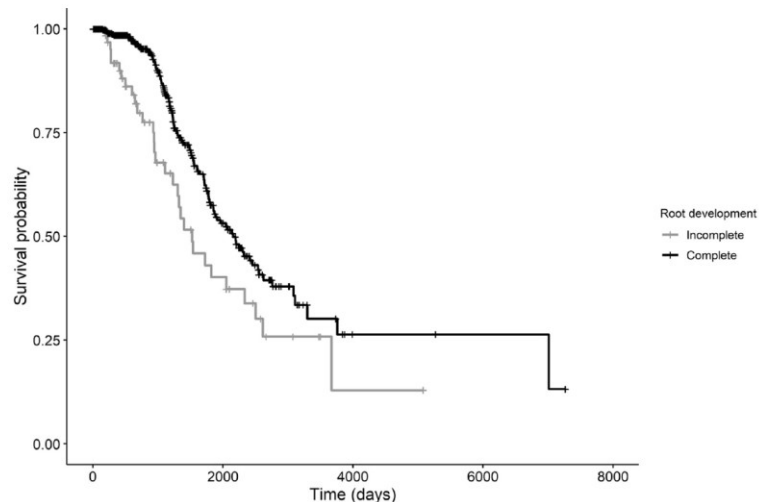
**RESULTS**

Records of 871 patients with 1288 replanted permanent teeth were analyzed. After applying the exclusion criteria, the final sample comprised 576 patients, 394 males (68.4%) and 182 females (31.6%), with a mean age of  $13.3 \pm 6.9$  years (range, 5.1–73.2 years) at the moment of trauma. A total of 767 permanent replanted teeth after avulsion were followed up for a median period of 2.7 years. Considering that 145 patients suffered avulsion in more than 1 tooth and that time to event/censoring was strongly correlated among teeth from the same patient, only 1 tooth was randomly selected to better set convergence criteria in the statistical models. Therefore, the final sample consisted of 576 teeth. Five hundred two teeth (87.0%) had complete root formation (stages 5 and 6), and 74 teeth (13.0%) were classified as immature teeth (stages 2, 3, and 4). The extra-alveolar period ranged from 5 minutes–7 days (median period, 120 minutes), and only 40 teeth (7.1%) were replanted within 15 minutes of the trauma event. Sample distribution regarding the storage condition showed that 233 teeth (41.2%) were stored dry, 133 (23.5%) were stored in milk and 105 (18.6%) in saline solution. Water (13.4%) and saliva (3.3%) were also used as storage media. SAT was prescribed in 17.4% of the cases. The medium time elapsed from replantation to pulp extirpation was 60 days, and the medium period of CaOH intracanal dressing was 1 year. The median splinting duration was 48 days (range, 15 days–5 years). Necrosis was the most frequent pulpal outcome and was observed in 96.7% of the cases. Pulp canal obliteration was observed in 3 teeth (0.5%), bone ingrowth into the root canal was observed in 11 teeth (1.9%), and pulp survival without radiographic changes was observed in 5 teeth (0.9%). Pulpal healing was only observed in immature teeth, because it was inversely proportional to root development (Table 1). Periodontal healing was observed in only 8.9% of the sample (51 teeth), whereas ERR was observed in almost all cases (525 teeth, 91.1%), most of them with RERR (379 teeth, 65.8%). IERR was observed in 145 cases (25.4%).

**Survival Analysis**

By the end of the present study, 435 of the 576 replanted teeth (85.5%) being followed up were censored, and 141 (24.5%) were lost/extracted because of different causes presented in Table 2. Tooth loss/extraction

## ARTICLE IN PRESS



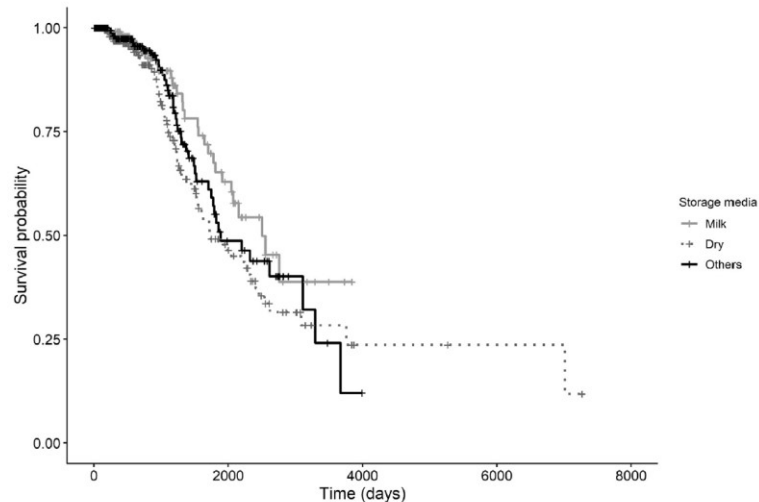
**FIGURE 1** – Kaplan-Meier survival curves for root development. Replanted permanent teeth with incomplete root development had lower survival rate compared with those with complete root development ( $P = .002$ ).

was a rare event among teeth with pulpal healing (Table 3), and a global median survival of 5.5 years was observed.

Table 4 shows univariate and multivariate analyses of potential predictors of tooth survival after replantation. The univariate analysis showed that gender, prescription of SAT, tooth group, concomitant crown

fractures in the avulsed tooth, length of extra-alveolar period, timing of pulpectomy, obturation, and splinting were not significant predictors of replanted tooth survival. Patient's age at trauma and stage of root development were nominally significant predictors ( $P \leq .05$ ). Considering that patient's age and the stage of root development are closely correlated, these

2 variables were tested separately in distinct multiple Cox regression models including extra-alveolar storage condition because its nominal  $P$  value was  $< .30$ . In the first model, the increase of 1 year of age reduced the rate of replanted tooth loss/extraction for patients younger than 16 (hazard ratio [HR] = 0.894; 95% confidence interval [CI], 0.79–0.92;



**FIGURE 2** – Kaplan-Meier survival curves for storage condition. Survival expectation for teeth stored in milk was significantly higher when compared with those kept dry during the extra-alveolar period ( $P = .015$ ).

## ARTICLE IN PRESS

$P < .001$ ). Beyond this limit, patient's age at the moment of trauma did not affect the survival of replanted permanent teeth ( $P = .216$ ). In the second model including the stage of root development, the loss/extraction rate for replanted teeth with full length of root development was half of that for immature teeth (HR = 0.513; 95% CI, 0.34–0.38;  $P = .002$ ). The survival rate for immature teeth was 50% after 4.2 years, and the survival rate for mature teeth was 50% after 5.5 years. In both models, the survival expectation for teeth stored in milk was significantly higher when compared with those kept dry during the extra-alveolar period (HR = 0.564; 95% CI, 0.35–0.89;  $P = .015$ ). Storage in other media did not affect long-term maintenance of replanted teeth. Kaplan-Meier curves comparing survival function, considering the categorical variables stage of root development and storage condition, are shown in Figures 1 and 2, respectively.

## DISCUSSION

The present study retrospectively evaluated the survival of permanent teeth that were replanted after traumatic avulsion. Few studies have conducted survival analysis, despite the importance of quantitative information about replantation prognosis to support treatment decision-making. Survival analysis presents an interesting approach because it consists of the evaluation of the time interval until a given event of interest. In addition, survival analysis is convenient for longitudinal evaluation of traumatized teeth, because it allows the incorporation of censored data, with partial observation of the response, into the statistical analysis. This is particularly useful because of the long periods required to reach a reasonable sample size for clinical research in dental trauma<sup>21,22</sup>. It is worth noting the unique features of our sample regarding its huge size and control of confounding factors related to replantation procedures during emergency care.

The tooth loss/extraction rate of 24.5% observed by the end of the present study is consistent with previous survival analyses showing tooth loss rates ranging from 23% to 35.7%<sup>8–12</sup>. The overall survival expectation observed in the present sample was 50% after 5.5 years, which is closer to the 4.7 years reported by Pohl et al<sup>10</sup>. However, it is different

from the 2.5 years reported by Petrovic et al<sup>11</sup> and the 5.5 years for immature teeth and 11 years for teeth with full length of root development reported by Wang et al<sup>12</sup>.

The results of the present study also demonstrated that the increase in patient's age at the moment of trauma, up to 16 years, was associated with a better prognosis. In addition, the survival rate for replanted mature teeth was significantly higher as well as for those stored in milk. These findings are consistent with previous reports showing that replanted mature teeth have higher survival expectancy<sup>8,9,11,12</sup>. Although evaluated outcomes were different, the present results are also consistent with those from a single previous longitudinal study showing that dry storage, in contrast to milk, as well as immature roots and younger patients' age at trauma, increased the risk of tooth loss after replantation<sup>23</sup>. The present results showing the increased survival rate of teeth stored in milk are also consistent with a vast experimental literature demonstrating that milk is a suitable storage medium for avulsed teeth because of its unique combination of nutrients and physiological pH of 6.5–7.2<sup>24–26</sup>.

Results of the present study suggest that SAT did not affect the long-term survival of avulsed teeth. Although some experimental results have suggested that SAT prescription may reduce IERR in replanted permanent teeth<sup>27,28</sup>, to date, clinical evidence regarding the benefits of SAT in the periodontal healing or in the long-term fate of replanted teeth is inconclusive<sup>3,10–12,15,29,30</sup>. However, this area demands further investigation because clinical studies, including the present one, diverge or lack important details such as the type, dosage, and duration of antibiotics prescribed. In addition, no studies have assessed patient compliance with the treatment.

An unexpected finding of the present study was the fact that neither the extra-alveolar period nor the timing of endodontic therapy steps (pulpectomy, CaOH dressing, and definitive filling) affected the survival rate after replantation. Taken together, these findings bring up a recurrent question regarding the evaluation of replantation outcomes. Although there is no doubt that the

above-mentioned factors do affect the periodontal healing patterns after replantation, the corollary that these associations are reflected in the survival of replanted teeth was not confirmed by the current results. In the present study, survival function was an objective measure defined as the interval that a replanted tooth remained functional without any signs of infection or local arrest of alveolar bone growth. Such criteria are supported by the concept that keeping a replanted tooth, even if periodontal healing patterns have not been ideal, can be considered successful replantation provided it does not compromise bone maintenance for future definitive rehabilitation in growing patients<sup>16–18</sup>. Although RERR represented a common finding in the present sample, RERR did not necessarily imply tooth loss/extraction. Although there is a risk of late sequelae such as infraocclusion and impairment of local bone growth, RERR cannot be considered a pathologic process *per se* and may allow maintaining the tooth for longer periods before removal becomes necessary. ERR is diagnosed during the follow-up after replantation. For this reason, it could not be treated statistically as a prognostic factor in the survival analysis because, by definition, such factors must be measured in the baseline, ie, at the time of replantation. Future investigations exploring other longitudinal models to evaluate long-term prognosis of distinct periodontal healing patterns of replanted teeth are needed and may provide relevant information to support treatment decisions.

## CONCLUSION

Results of the present study showed that the overall survival rate of avulsed/replanted permanent teeth was 50% after 5.5 years. Increase in patient's age at the moment of trauma and the stage of root development were important prognostic factors for tooth survival after replantation. In addition, storage of avulsed teeth in milk during the extra-alveolar period enhanced the survival expectancy after replantation.

## ACKNOWLEDGMENTS

The present study was supported by grants from CNPQ, PRPq-UFMG, and MEC-PROExt.

## REFERENCES

1. Andreasen JO, Andreasen FM, Andersson L. Textbook and Color Atlas of Traumatic Injuries to the Teeth. Oxford, UK: Blackwell Munksgaard; 2007.
2. Trope M. Avulsion of permanent teeth: theory to practice. Dent Traumatol 2011;27:281–94.
3. Andersson L, Andreasen JO, Day P, et al. Guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2—avulsion of permanent teeth. Pediatr Dent 2016;38:369–76.

## ARTICLE IN PRESS

4. Kenny DJ, Casas MJ. Medicolegal aspects of replanting permanent teeth. *J Can Dent Assoc* 2005;71:245–8.
5. Barrett EJ, Kenny DJ. Avulsed permanent teeth: a review of the literature and treatment guidelines. *Endod Dent Traumatol* 1997;13:153–63.
6. Kenny KP, Day PF, Sharif MO, et al. What are the important outcomes in traumatic dental injuries? an international approach to the development of a core outcome set. *Dent Traumatol* 2018;34:4–11.
7. Andreasen FM, Andreasen JO. Treatment of traumatic dental injuries: shift in strategy. *Int J Technol Assess Health Care* 1990;6:588–602.
8. Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors: 1—diagnosis of healing complications. *Endod Dent Traumatol* 1995;11:51–8.
9. Barrett EJ, Kenny DJ. Survival of avulsed permanent maxillary incisors in children following delayed replantation. *Endod Dent Traumatol* 1997;13:269–75.
10. Pohl Y, Wahl G, Filippi A, et al. Results after replantation of avulsed permanent teeth: III—tooth loss and survival analysis. *Dent Traumatol* 2005;21:102–10.
11. Petrovic B, Marković D, Peric T, et al. Factors related to treatment and outcomes of avulsed teeth. *Dent Traumatol* 2010;26:52–9.
12. Wang G, Wang C, Qin M. A retrospective study of survival of 196 replanted permanent teeth in children. *Dent Traumatol* 2019;00:1–8.
13. Bastos JV, Côrtes MIS. Traumatismo Dentário. *Arquivos em Odontologia* 2011;47:80–5.
14. Moorrees CFA, Fanning EA, Hunt EE Jr. Age variation of formation stages for ten permanent teeth. *J Dent Res* 1963;42:1490–502.
15. Bastos JV, Côrtes MIS, Andrade Goulart EM, et al. Age and timing of pulp extirpation as major factors associated with inflammatory root resorption in replanted permanent teeth. *J Endod* 2014;40:366–71.
16. Trope M. Clinical management of the avulsed tooth: present strategies and future directions. *Dent Traumatol* 2002;18:1–11.
17. McIntyre JD, Lee JY, Trope M, et al. Management of avulsed permanent incisors: a comprehensive update. *Pediatr Dent* 2007;29:56–63.
18. Malmgren B. Ridge preservation/decoronation. *Pediatr Dent* 2013;35:164–9.
19. Andersson L, Bodin I, Sörensen S. Progression of root resorption following replantation of human teeth after extended extraoral storage. *Endod Dent Traumatol* 1989;5:38–47.
20. Azur MJ, Stuart EA, Frangakis C, et al. Multiple imputation by chained equations: what is it and how does it work? *Int J Methods Psychiatr Res* 2011;20:40–9.
21. Dekker FW, De Mutsert R, Van Dijk PC, et al. Survival analysis: time-dependent effects and time-varying risk factors. *Kidney Int* 2008;74:994–7.
22. George B, Seals S, Aban I. Survival analysis and regression models. *J Nucl Cardiol* 2014;21:686–94.
23. Rhouma O, McMahon AD, Welbury RR. Early prognostic indicators and outcome prediction model for replanted avulsed teeth. *Eur Arch Paediatr Dent* 2012;13:203–9.
24. Blomlöf L. Milk and saliva as possible storage media for traumatically exarticulated teeth prior to replantation. *Swed Dent J Suppl* 1981;8:1–26.
25. Udoye CI, Jafarzadeh H, Abbott PV. Transport media for avulsed teeth: a review. *Aust Endod J* 2012;38:129–36.
26. Poi WR, Sonoda CK, Martins CM, et al. Storage media for avulsed teeth: a literature review. *Braz Dent J* 2013;24:437–45.
27. Hammarström L, Blomlöf L, Feiglin B, et al. Replantation of teeth and antibiotic treatment. *Dent Traumatol* 1986;2:51–7.
28. Sae-Lim V, Wang CY, Trope M. Effect of systemic tetracycline and amoxicillin on inflammatory root resorption of replanted dogs' teeth. *Endod Dent Traumatol* 1998;14:216–20.
29. Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, et al. Replantation of 400 avulsed permanent incisors: 4—factors related to periodontal ligament healing. *Dent Traumatol* 1995;11:76–89.
30. Hincckfuss SE, Messer LB. An evidence-based assessment of the clinical guidelines for replanted avulsed teeth: part II—prescription of systemic antibiotics. *Dent Traumatol* 2009;25:158–64.