

JULIANA VILELA BASTOS

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS, QUIMIOCIAS E
METALOPROTEINASES E ASSOCIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE SEUS
POLIMORFISMOS, EM REABSORÇÕES RADICULARES INFLAMATÓRIAS E POR
SUBSTITUIÇÃO APÓS REIMPLANTE DE DENTES PERMANENTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do
Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadores:

Profa. Dra. Walderez Ornelas Dutra

Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

Colaboradores:

Profa. Dra. Maria Ilma de Souza Côrtes

Programa Traumatismos Dentários
Departamento de Odontologia Restauradora
Faculdade de Odontologia – UFMG

Profa. Dra. Tarcília Aparecida da Silva

Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológica
Faculdade de Odontologia - UFMG

Profa. Dra. Jeane de Fátima Correia Silva

Departamento de Clínica Patologia e Cirurgia Odontológica (Pós-doutorado)
Faculdade de Odontologia – UFMG

Prof. Dr. Eugenio Marcos Andrade Goulart

Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina – UFMG

Prof. Dr. Enrico Antonio Colosimo

Departamento de Estatística
Instituto de Ciências Exatas – UFMG

Realização - Apoios:

Programa de Traumatismos Dentários – FO – UFMG

Pbext – PROEx - UFMG

FMP– CENEX – FO – UFMG

LABIC – Laboratório de Interações Celulares – ICB – UFMG

CNPq, FAPEMIG, INCT-DT, SCTIE-DECIT-MS

Laboratório de Biologia Celular - FO – UFMG

CNPq, FAPEMIG, CAPES

Laboratório de Patologia Bucal – FO – UFMG

CNPq, FAPEMIG



Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE

JULIANA VILELA BASTOS

127/2014/07
entrada
2º/2010
2010720797

Às **treze horas** do dia **16 de julho de 2014**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado de Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**Estudo da expressão de citocinas, quimiocinas e metaloproteinases, e associação da ocorrência de seus polimorfismos, em reabsorções radiculares inflamatórias e por substituição após reimplante de dentes permanentes**" requisito final para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular, área de concentração: **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Walderez Ornelas Dutra**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Walderez Ornelas Dutra (Orientadora)	UFMG	APROVADA
Dr. João Carlos Gabrielli Biffi	UFU	APROVADO
Dr. Germano Carneiro Costa	UFV	APROVADA
Dra. Annamaria Ravara Vago	UFMG	Aprovada
Dr. Eduardo Nunes	PUC- Minas	APROVADO

Pelas indicações, o candidato foi considerado: aprovado
O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 16 de julho de 2014.**

Dra. Walderez Ornelas Dutra (Orientadora) [assinatura]
Dr. João Carlos Gabrielli Biffi [assinatura]
Dr. Germano Carneiro Costa [assinatura]
Dra. Annamaria Ravara Vago [assinatura]
Dr. Eduardo Nunes [assinatura]

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

[assinatura]
Prof.ª Lucrécia de Oliveira Andrade
Sub-Coordenadora do Programa de
Pós Graduação em Biologia Celular ICB / UFMG

DEDICATORIA

Aos meus filhos,

Vittória, Samuel e Nicolas,

aos meus alunos

e aos pacientes do Programa Traumatismos Dentários

meus grandes estímulos para realizar este trabalho!!

EPIGRAFE

“Nosso medo mais profundo não é sermos inadequados...

Nosso medo mais profundo é que somos poderosos além de qualquer medida.

É a nossa luz, não as trevas, o que mais nos apavora.

Nós nos perguntamos: “quem sou eu para ser brilhante, maravilhoso, talentoso e fabuloso?”

Na realidade, quem é você para não ser?

Você é filho do Universo!

Se você se fizer de pequeno não vai ajudar o mundo.

Não há iluminação em se encolher ...

Nascemos para manifestar a glória do Universo, que esta dentro de nós. Não está apenas em um de nós, está em todos nós.

Conforme deixamos a nossa própria luz brilhar, inconscientemente damos às outras pessoas permissão para fazer o mesmo.”

Mandela

AGRADECIMENTOS

Escrever estes agradecimentos constituiu-se na última etapa da redação deste trabalho. Foi um momento forte... uma retrospectiva emocionante durante a qual fui sendo tomada por uma grande consciência de que não estamos sozinhos... Não somos seres solitários! Estamos todos conectados numa grande rede solidária e fraterna que nos sustenta e provê de todo o necessário para concretizarmos nossa lenda pessoal, nossa verdadeira missão nesta vida! Me senti feliz e recompensada por um dia, escutando o meu coração, ter tido a coragem de, mesmo após 20 anos de carreira como professora, tirar meus planos da gaveta e começar este doutorado...com fé na vida e no que viria!... E fui inundada por um sentimento de reverência e gratidão por todos que com sua luz, ao longo da minha trajetória, fizeram brilhar a minha centelha divina!....

Agradeço à minha mãe Maria do Carmo - que me ensinou a transcendência da vida, e ao meu pai Jasílio, que me ensinou a colocar em prática a transcendência da vida na lida de cada dia. Eles que começaram a família Vilela Bastos: inicialmente composta por Ana, André, Juliana, Júnia, Jasílio e Ismael e que aos poucos foi agregando novos membros: Paulo, Rita, Luca, Luiz, Lygia, Raquel, Laura, Vinicius, Rafa, Vittoria, Samuel e Nicolas, e André! - Agradeço por pertencer a este núcleo rico de afeto, companheirismo e alegria!

Agradeço ao Luca, parceiro querido neste maravilhoso e ousado projeto de tecer uma teia junto com Vittoria, Samuel e Nicolas !...

Agradeço à Vittoria, ao Samuel e ao Nicolas, estrelas guia que me têm norteado em momentos de confusão e tormenta!...

Agradeço à Nonna Luciana, mulher forte e corajosa, que afiou a minha espada e me ensinou o significado da palavra “cuidar”...Lá, aonde ela estiver, tenho certeza que esta vibrando comigo!....

Agradeço à Professora Walderez Ornelas Dutra, pela sensibilidade e boa vontade com que me acolheu colocando toda a sua infraestrutura, sabedoria e expertise à disposição deste projeto, e pelo suporte sólido, consistente e assertivo durante o doutorado.

Agradeço ao Prof. Ricardo Santiago Gomez, acadêmico brilhante e dedicado, cuja visão à frente do seu tempo vem abrindo portas e criando oportunidades a todos nós, professores da Faculdade de Odontologia da UFMG.

Agradeço à amiga Ilma, companheira incansável de tantas empreitadas profissionais e pessoais, com quem divido um projeto de vida chamado Traumatismos Dentários. Plagiando as suas próprias palavras: “*os bordados de nossas vidas se confundem*”. Agradeço também e reverencio a Professora Maria Ilma, cuja trajetória revolucionou o ensino do Traumatismo Dentário no Brasil!

Agradeço imensamente ao Prof. Eugenio Marcos Andrade Goulart, grande amigo e mestre nas trilhas da vida e das montanhas, pela retaguarda segura, serena e compreensiva, presente desde os primeiros esboços e ao longo de todas as etapas deste projeto.

Agradeço ao Prof. Enrico Antonio Colosimo que de forma tão elegante e competente me orientou nas análises estatísticas desta tese, conferindo-lhes excelência e precisão. Sua paciência e sabedoria tornaram esta fase do trabalho um momento ímpar, de intenso aprendizado.

Agradeço à Jeane de Fátima, então aluna de Pós-Doutorado, agora Profa. Jeane, pela paciência, disponibilidade, delicadeza e habilidade no dia a dia dos experimentos.

Agradeço à Profa. Tarcilia Aparecida da Silva, outrora aluna bolsista do Programa de Traumatismos e hoje brilhante pesquisadora, que generosamente disponibilizou sua equipe, sua infraestrutura, seu material, seu tempo e seus conhecimentos para realização da etapa dos experimentos com ELISA.

Ao Celso Queiroz, pela valiosa, primorosa e bem humorada ajuda na condução dos experimentos com ELISA.

Ao Danilo, parceiro lado a lado em todas as etapas, e à Daniela, voluntária no Programa Traumatismos Dentários desde 2006. Ambos bolsistas do Projeto, não mais saíram de lá! Jovens promessas que, espero, levem adiante esta causa!

Agradeço às Professoras Kátia e Sandra Maltos, pela amizade sincera e solidária ao longo de todos estes anos, particularmente durante o doutorado.

Agradeço aos professores do LABIC, Paula, Miscena, Ken e Rodolfo pela amizade. Em especial, agradeço à professora Juliana Stanislau, amiga generosa que gentilmente nos cedeu os *kits* para genotipagem dos SNPs da MMP2.

Aos bolsistas do Programa Traumatismos Dentários, em particular ao Victor, fiel escudeiro que nesta última etapa da redação, “pegou o boi pelo chifre” junto comigo!

Às funcionárias do Programa Traumatismos Dentários, Cristina e Erika, pela disponibilidade e apoio incondicional a cada empreitada.

À querida Deliane pelo cuidado comigo e com minha família com carinho e delicadeza irretocáveis! Sem o seu apoio jamais teria chegado tão longe.

Aos alunos do LABIC e aos colegas do curso de doutorado, em especial ao Léo. Adotada por eles, sou grata pela parceria e companheirismo.

À egrégora do PathWork, em especial ao meu grupo, à Fátima, nossa facilitadora, e à Junia, minha irmã de sangue e de alma, pelo suporte e guiança que não me deixam desistir nunca!

RESUMO

Palavras-chave: reabsorções dentárias, avulsão dentária, reimplante dentário, polimorfismos genéticos, citocinas, metaloproteinases

As reabsorções radiculares externas (RRE) constituem-se na sequela mais frequente após o reimplante de dentes permanentes, representando a principal causa de perda dentária pós-trauma. Podem ser classificadas em dois grandes grupos: reabsorções radiculares externas inflamatórias (RREI), e reabsorções radiculares externas por substituição (RRES). O presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência, evolução, fatores determinantes, bem como a expressão de citocinas, quimiocinas e MMPs em dentes portadores de RREI e RRES. Nossa hipótese inicial era de que esses fatores estariam associados diferentemente à ocorrência de RREI e RRES. Para tanto a atividade de reabsorção foi avaliada radiograficamente em 165 pacientes em tratamento na Clínica de Traumatismos Dentários da FO-UFMG portadores de 205 dentes reimplantados após avulsão traumática. Os pacientes foram genotipados para polimorfismos nos genes que codificam para as citocinas IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-10, RANK, RANKL, OPG, MMP2 e MMP9 pelo método de RT-PCR. Os níveis de citocinas, quimiocinas e MMPs foram dosados pelo método ELISA no tecido perirradicular de dentes portadores de diferentes padrões radiográficos de RRE. Nossos resultados demonstraram que a atividade inicial de RREI foi influenciada principalmente por idades mais jovens no momento do trauma, considerando-se os pontos de corte de 11anos (RC 0,36 IC 95% 0,15 – 0,85 p=0,02) e 16 anos (RC 0,23 IC 95% 0,08-0,65 p=0,02), pelo tempo decorrido entre o reimplante e o início do TER (RC 1,012, IC 95% 1,003 – 1,020, p=0,005), pela presença do alelo T no SNP rs 1800896 no gene *IL10* (RC 0,35 IC 95% 0,13-0,94 p=0,038) e pela presença do alelo C no SNP rs 2073618 no gene *TNFRSF11B* (OPG) (RC 0,28 IC 95% 0,09 – 0,93 p=0,038). A análise multivariada pelo modelo de Cox demonstrou uma progressão mais lenta da RRES em pacientes com idade superior a 16 anos no momento do trauma (RTF 0,29 IC 95% 0,13 – 0,67 p=0,004), em pacientes portadores do genótipo homocigoto para a variante alélica C (CC) no SNP rs 419598 no gene *IL1RN* (RTF 0,33 IC95% 0,15-0,73 p= 0,006) e nos dentes armazenados no leite (RTF 0,30 IC 95% 0,15 – 0,64 p= 0,002) ou outros meios úmidos como soro, saliva ou água (RTF 0,50 IC 95% 0,3 – 0,83 p=0,007). Por outro lado, uma progressão mais rápida da RRE foi observada nos dentes com períodos extra-alveolares longos (RTF 2,97 IC 95% 1,0 – 8,83 p= 0,049) e imobilização prolongada (RTF 1,002 IC 95% 1,00-1,003 p=0,04) e nos pacientes portadores de homocigose para o alelo T no SNP rs 1800587 no gene *IL1A* (RTF 1,87 IC 95% 0,99-3,51 p= 0,054). O estudo da expressão de citocinas quimiocinas e MMPs no tecido perirradicular de dentes portadores de RRE demonstrou que os níveis de IL-1RA, IL-6, IL-8, IFN γ , TNF α , TGF β , CCL5, RANK e OPG foram significativamente maiores nos dentes portadores de RRE quando comparados com o grupo controle, sem reabsorção. As concentrações de IL-1 β e TNF- α foram significativamente maiores na RREI do que na RRES (p=0,02). RRES por sua vez apresentou níveis mais elevados de MMP2 em relação a RREI (p<0,001). Em conjunto, nossos resultados sugerem que importantes fatores locais estimuladores da reabsorção óssea também participam na modulação da RREI, assim como marcadores do processo de remodelação óssea como a MMP2 estão presentes na RRES. A atividade de RREI antes do início do TER, foi influenciada pela idade do paciente no momento do trauma e pelo tempo transcorrido entre o reimplante e o início do TER. Já a progressão de RRES no longo prazo foi influenciada pela idade no momento do trauma, meio de armazenamento e duração do período de imobilização do dente avulsionado. Polimorfismos nos genes que codificam para as citocinas IL-10, IL-1 α , IL-1RA e OPG podem estar associados a fatores de susceptibilidade determinantes da evolução mais agressiva e grave das RRE pós-traumáticas.

ABSTRACT

Keywords: external root resorption, tooth avulsions, tooth replantation, cytokines, SNPs

External root resorption (**ERR**) is a serious complication following replantation and its progressive forms - inflammatory external root resorption (**IERR**) and replacement external root resorption (**RERR**) - quite often lead to tooth loss with relevant functional, aesthetic, psychosocial and economic consequences. Not much is known about the role of the host immune response in the prognosis of tooth replantation. Considering the pivotal role of soluble factors in controlling mineralized tissue resorption the aim of the present study was to identify and quantify cytokines, chemokines and MMPs in teeth showing different patterns of ERR. In addition, patient's genotype in SNPs in genes that code for these factors, along with demographic and clinical factors, were evaluated for their possible influence in the occurrence, extension and progression of RRE in 205 replanted permanent mature teeth from 165 patients treated at the Dental Trauma Clinic at the School of Dentistry of Federal University of Minas Gerais (DTC – SD – FUMG) in Belo Horizonte, Brazil. Our working hypothesis was that these immunological and genetic factors influenced differently the occurrence of IERR and RERR. Patients older than 16 years at the moment of trauma had a lower chance of developing IERR (OR 0.23 IC 95% 0.08 – 0.65 p= 0.005) and also had lower rates of RERR progression in the long term (HR 0.29 IC 95% 0.13 – 0.67 p=0.004). Patients under 11 years of age had a higher chance of developing severe IERR before the onset of endodontic therapy (OR 0.36 IC 95% 0.15 – 0.85 p=0.02). Each day that elapsed between the replantation and the pulp extirpation increased the risk of severe IERR by 0.5% per day but did not affected RERR progression. Wet storage media, especially milk (HR 0.30 IC 95% 0.15 – 0.64 p= 0.002) had a protective effect, while prolonged periods of extra-alveolar storage (HR 2.97 IC 95% 1.0 -8.83 p= 0.049) and splinting time (HR 1.002 IC 95% 1.00-1.003 p=0.04) determined faster progression of RRE in the long term. SNPs in the *IL10* (OR 0.35 IC 95% 0.13-0.94 p = 0.038) and *TNFSR11B* (OR 0.28 IC 95% 0.09 – 0.93 p=0.038) genes were associated with the occurrence and extension of IERR observed at the onset of endodontic therapy. SNPs in the *IL1A* (RTF 1.87 IC 95% 0.99-3.51 p=0.054) was also associated with the faster progression of RRE in the long term. Teeth bearing RRE irrespective of the type, showed higher levels of IL-1RA, IL-6, IL-8, IFN γ , TNF α , TGF β , CCL5, RANK e OPG when compared to the control group (no resorption). Teeth bearing IERR showed higher levels of IL-1 β (p=0,02) and TNF- α (p<0,001) when compared to teeth with RERR. MMP2 was found in higher concentrations in the RERR group when compared with EIRR (p<0,001). In conclusion our results confirmed that age at the moment of trauma and timing of pulpectomy are important risk factors for IERR prior to the onset of endodontic therapy. Storage condition of the avulsed teeth, splinting time and age at the moment of trauma had a marked effect on the rate of RERR progression in the long term. Taken together our results suggested that local factors that modulate bone resorption acted differently in IERR and RERR and that the patient's genetic profile may contribute in the outcome after tooth replantation.

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BR – Brasil

CTD - FO-UFMG - Clínica de Traumatismos Dentários - Faculdade de Odontologia da Universidade
Federal de Minas Gerais

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

EGF – Fator de crescimento epidérmico

ELISA – Ensaio imunoenzimático

GEE - Equações de estimação generalizadas

IADT – Associação Internacional de Traumatologia Dentária

IL-1 – Interleucina 1

IL-10 - Interleucina 10

IL-17 - Interleucina 17

IL-1R1 – Receptor para interleucina 1 tipo 1

IL-1RA - Antagonista de receptor da interleucina 1

IL-1 α – Interleucina 1 α

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-4 - Interleucina 4

IL-6 - Interleucina 6

IL-8-CXCL8 – Interleucina 8 ou fator quimiotático para neutrófilos

INF γ - Interferon gama

LP – Ligamento periodontal

LTD – Lesões traumáticas dentárias

LPS - Lipopolissacarídeos

M-CFS - Fator estimulador de colônias para monócitos

MCP-1/CCL2 - Proteína quimiotática para monócitos

MCE – Matriz extracelular

MIP-1 α /CCL3 - Proteína inflamatória para macrófago - 1 α

MMP2 – Metaloproteinase de matriz 2

MMP9 – Metaloproteinase de matriz 9

MMPs – Metaloproteinases da matriz

NY – Nova Iorque

OCLs – Osteoclastos

OEF - Osteólise Expansiva Familiar

OPG - Osteoprotegerina

PBS – Tampão salina-fosfato

RT - PCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

PGE2 – Prostaglandina 2

PMN - Neutrófilos polimorfonucleares

PR - Paraná

PTH - Paratormônio

PTHrP - Proteína relacionada ao paratormônio

RANK - Receptor ativador do fator nuclear kappa

RANKL - Ligante do receptor de ativação do fator nuclear kappa

RANTES/CCL5 - Fator quimiotático para linfócitos T

RRE – Reabsorção radicular externa

RREA - Reabsorção radicular externa apical

RREI - Reabsorção radicular externa inflamatória

RRES - Reabsorção radicular externa por substituição

SNPs - Polimorfismos de nucleotídeo único

TCCB - Tomografias computadorizadas de *cone beam*

TGF- β - Fator de crescimento transformante beta

TIMPs - Inibidores teciduais de metaloproteinases

TNF - Fator de necrose tumoral

TNF α - Fator de necrose tumoral α

TNF β - Fator de necrose tumoral β

TLRs - Receptores tipo Toll

TRAF6 - Fator associado ao fator de necrose tumoral 6

USA – Estados Unidos da América

VNTR - Variação do número de repetições *in tandem*

PMSF – Fluoreto de Fenilmetilsulfonil

RPMI – Meio de cultura celular desenvolvido pelo Roswell Park Memorial Institute

TER - Tratamento endodôntico radical

IgG - Imunoglobulina G

mRNA – RNA mensageiro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Aspecto radiográfico e histopatológico da RREI.....	32
Figura 2– Aspecto radiográfico e histopatológico da RRES.....	32
Figura 3- Desenho esquemático do critério para cálculo do índice radiográfico de reabsorção.....	48
Figura 4- Aspecto radiográfico da RREI.....	49
Figura 5- Aspecto radiográfico da RRES.....	49
Figura 6- Aspecto radiográfico de reabsorção mista.....	49
Figura 7– Gráficos representativos da PCR em tempo real para a análise do SNP rs 1800587 <i>IL1A</i>	52
Figura 8- Curva de Kaplan-Meier ilustrando a taxa de progressão da RRE e RRES de acordo com a idade no momento do trauma.....	86
Figura 9- Curva de Kaplan-Meier ilustrando a taxa de progressão da RRE e RRES de acordo com o meio de armazenamento.....	87
Figura 10- Curva de Kaplan-Meier ilustrando a taxa de progressão da RRE e RRES de acordo com os genótipos do SNP rs 1800587 no gene <i>IL1A</i>	88
Figura 11- Curva de Kaplan-Meier ilustrando a taxa de progressão da RRE e RRES de acordo com os genótipos do SNP rs 419598 no gene <i>IL1RN</i>	89
Figura 12- Comparação dos níveis de IL-1 β e TNF- α no grupo controle e nos grupos amostrais.....	94
Figura 13- Comparação dos níveis de IL-6, IL-17A e IFN γ . no grupo controle e nos grupos amostrais.....	95
Figura 14- Comparação dos níveis de IL-1RA, TGF β , IL-10 e IL-4 no grupo controle e nos grupos amostrais.....	97
Figura 15- Comparação dos níveis de OPG e RANK no grupo controle e nos grupos amostrais.....	98
Figura 16- Comparação dos níveis de IL-8, CCL5, CCL2 e CCL3 no grupo controle e nos grupos amostrais.....	100
Figura 17- Comparação dos níveis de MMP2 e MMP9 no grupo controle e nos grupos amostrais.....	101

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Distribuição de frequência da amostra de acordo com o de dente acometido	58
Gráfico 2- Distribuição da amostra segundo o tipo de reabsorção radicular externa observada na consulta inicial e ao final do acompanhamento	60
Gráfico 3- Distribuição de frequência dos dentes segundo o índice inicial e máximo de RRE	60
Gráfico 4- Distribuição da subamostra utilizada para a quantificação de citocinas, quimiocinas e metaloproteinases segundo o tipo de RRE observada na data da extração	91
Gráfico 5- Distribuição da subamostra utilizada para a quantificação de citocinas, quimiocinas e metaloproteinases segundo o índice de RRE observada na data da extração	91

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Substâncias propostas como meio de armazenamento para dentes avulsionados	39
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relação dos polimorfismos estudados	51
Tabela 2- Reagentes utilizados na RT PCR	52
Tabela 3- Relação das citocinas, quimiocinas e MMPs quantificadas e kits comerciais utilizados	54
Tabela 4- Distribuição de frequência dos dentes segundo o meio de armazenamento e período extra-alveolar	59
Tabela 5- Distribuição de frequências dos genótipos e alelos dos SNPs estudados nos genes <i>IL1A</i> , <i>IL1B</i> , <i>IL1RN</i> e <i>IL10</i>	62
Tabela 6 -Distribuição de frequências dos genótipos e alelos dos SNPs estudados nos genes <i>TNFRSF11A(RANK)</i> , <i>TNFRSF11B(OPG)</i> e <i>TNFSF11(RANKL)</i>	63
Tabela 7- Distribuição de frequências dos genótipos e alelos dos SNP estudados nos genes <i>MMP2</i> e <i>MMP9</i>	64
Tabela 8-Análise univariada da associação entre idade, fatores relacionados ao manejo e tratamento do dente avulsionado e o tipo de RRE inicial	67
Tabela 9- Análise univariada da distribuição genotípicas dos SNPs estudados nos genes <i>IL1A</i> , <i>IL1B</i> , <i>IL1RN</i> e <i>IL10</i> de acordo com o tipo de RRE inicial	68
Tabela 10- Análise univariada das frequências genotípicas dos SNPs estudados nos genes <i>TNFRSF11A (RANK)</i> , <i>TNFRSF11B (OPG)</i> , <i>TNFSF11 (RANKL)</i> e <i>MMP2</i> de acordo com o tipo de RRE inicial	69
Tabela 11- Análise univariada da associação entre idade, fatores relacionados ao manejo e tratamento do dente avulsionado e o tipo de RRE final	72
Tabela 12- Análise univariada da associação dos SNPs estudados nos genes <i>IL1A</i> , <i>IL1B</i> , <i>IL1RN</i> e <i>IL10</i> de acordo com o tipo de RRE final	73
Tabela 13- Análise univariada da associação dos SNPs estudados nos genes <i>TNFRSF11A (RANK)</i> , <i>TNFRSF11B (OPG)</i> e <i>TNFSF11 (RANKL)</i> , e <i>MMP2</i> de acordo com o tipo de RRE final	74
Tabela 14- Análise da associação entre idade, fatores relacionados ao manejo e tratamento do dente avulsionado e a progressão da RRE final	77
Tabela 15- Análise da associação entre os genótipos dos SNPs estudados nos genes <i>IL1A</i> , <i>IL1B</i> , <i>IL1RN</i> , <i>IL10</i> e a taxa de progressão da RRE final	79
Tabela 16- Análise multivariada da associação entre idade, fatores relacionados ao manejo e tratamento do dente avulsionado, polimorfismos nos genes <i>IL1A</i> e <i>IL1RN</i> e a progressão da RRE final	81

Tabela 17- Análise da associação entre os genótipos dos SNPs estudados nos genes TNFSRF11A(RANK), TNFSRF11B(OPG), TNFSF11 (RANKL) e a taxa de progressão de RRE final	83
Tabela 18- Análise da associação entre os genótipos dos SNPs estudados no gene <i>MMP2</i> e a taxa de progressão de RRE final.....	85
Tabela 19- Concentração das citocinas, quimiocinas e MMPs nos grupos amostrais com RRE e no grupo controle sem RRE.....	93

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	20
2- REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 Mecanismos celulares e moleculares da reabsorção óssea	23
2.2 Mecanismos celulares e moleculares das reabsorções dentárias	27
2.3 Polimorfismos genéticos	33
2.3.1 Polimorfismos dos genes que codificam para a família IL-1	33
2.3.2 Polimorfismos no gene <i>IL10</i>	35
2.3.2 Polimorfismos nos genes que codificam para RANK-RANKL-OPG.....	35
2.3.4 Polimorfismos nos genes que codificam para a MMP-2 e MMP-9.....	36
2.4. O Papel de determinantes demográficos e clínicos na RRE após reimplantes de dentes permanentes	37
3- OBJETIVOS	44
4- MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 Seleção da amostra	46
4.2 Indicadores radiográficos da atividade de reabsorção radicular externa.....	47
4.3 Análise de polimorfismos	50
4.3.1 Obtenção das amostras e extração de DNA.....	50
4.3.2 Identificação dos genótipos	51
4.4 Quantificação de citocinas, quimiocinas e MMPs no tecido Perirradicular de dentes portadores de RRE.....	52
4.5 Análise estatística	55
5- RESULTADOS.....	59
5.1 Distribuição de frequência das variáveis explicativas e dos indicadores da atividade de reabsorção.....	58
5.1.1 Distribuição de frequência das variáveis relacionadas ao manejo dos dentes avulsionados	58
5.1.2 Distribuição de frequência dos indicadores da atividade de reabsorção.....	59
5.1.3 Distribuição de frequência das variáveis genéticas.....	62

5.2 Estudo do efeito da idade, fatores relacionados ao manejo e tratamento do dente avulsionado e fatores genéticos na atividade de reabsorção inicial	67
5.2.1 Estudo da associação entre a idade, fatores relacionados ao manejo e tratamento do dente avulsionado e a atividade de reabsorção inicial	67
5.2.2 Estudo da associação entre os SNPs estudados e o tipo de reabsorção observada na consulta de início do TER	69
5.2.3 Estudo da associação entre os SNPs estudados e o índice de reabsorção observado na consulta de início do TER	70
5.3 Estudo da associação entre a idade, fatores genéticos manejo e tratamento do dente avulsionado, e a atividade de reabsorção no longo prazo.....	71
5.3.1 Estudo da associação entre a idade no momento do trauma fatores clínicos e genéticos e o tipo de reabsorção observado no longo prazo	71
5.3.2 Estudo da associação entre a idade no momento do trauma, fatores clínicos e genéticos com o índice de reabsorção observado no longo prazo.....	75
5.4 Estudo da expressão de fatores locais no tecido perirradicular de dentes portadores de reabsorções externas pós-traumáticas	90
5.4.1 Dados descritivos da subamostra utilizada para a quantificação de citocinas, quimiocinas e metaloproteinases.....	90
5.4.2 Expressão de fatores locais nos tecidos perirradiculares de dentes Portadores de dentes portadores de reabsorções radiculares externas.....	92
6- DISCUSSÃO.....	103
7- CONCLUSÕES	136
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139
9- ANEXOS.....	158

1- INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A avulsão dentária é uma lesão traumática que se caracteriza pelo completo deslocamento do dente de seu alvéolo, ocasionando danos à camada cementoblástica e levando à ruptura do feixe vascular-nervoso periapical e das fibras do ligamento periodontal (LP) (ANDREASEN e ANDREASEN, 2007). O reimplante dental consiste no reposicionamento de um dente em seu alvéolo e tem sido aceito como o tratamento de escolha das avulsões dentárias (ANDERSSON et al., 2012), embora seu prognóstico no longo prazo seja imprevisível. Enquanto alguns dentes podem permanecer em funcionamento durante décadas, muitos são perdidos levando a consequências funcionais, estéticas, psicológicas e econômicas relevantes (CÔRTEZ et al., 2002; MARCENES e RIDÅ, 2007). As reabsorções radiculares externas (RRE) constituem-se na sequela mais frequente após o reimplante de dentes permanentes, com prevalência relatada entre 74 e 96% e representam a principal causa de perda de dentes reimplantados (ANDREASEN e ANDREASEN, 2007). As RRE podem apresentar duas formas progressivas após o reimplante de dentes permanentes: reabsorções radiculares externas inflamatórias (RREI), e reabsorções radiculares externas por substituição (RRES) (ANDREASEN e ANDREASEN, 1992). Os fatores desencadeantes que estabelecem condições propícias à diferenciação e atividade clástica na superfície radicular são os mesmos em ambos os tipos de reabsorção, a saber: a presença de subprodutos da destruição tecidual bem como os componentes da resposta inflamatória que se estabelece em resposta à ruptura total das fibras periodontais e à lesão da camada cementoblástica. (ANDREASEN, 1985). As diferenças surgem posteriormente de acordo com a natureza do fator de manutenção que mantém continuamente o estímulo para osteoclastogênese tornando a reabsorção progressiva.. A participação bacteriana na etiopatogenia da RREI é bem estabelecida e foi demonstrada experimentalmente (ANDREASEN, 1981a, 1981b, TROPE et al., 1992) e sugerida em estudos clínicos especialmente após início tardio do tratamento endodôntico radical (ANDREASEN e HJÖRTING-HANSEN, 1966; COCCIA, 1980, ANDREASEN et al., 1995d, CHAPUIX e Von ARX, 2005, PETROVIC et al., 2010, WEDER et al., 2011). A etiopatogenia da RRES está relacionada com a perda do LP e da camada cementoblástica o que leva à colonização da superfície dentinária radicular por osteoblastos e osteoclastos seguida pela substituição gradual da estrutura radicular por tecido ósseo (ANDREASEN e HJÖRTING-HANSEN, 1966 a,b; HAMMARSTRÖM et al., 1989). Vários estudos clínicos e experimentais avaliaram o papel de fatores demográficos e clínicos, relacionados ao manejo e tratamento do dente avulsionado, na ocorrência e evolução das RRE após reimplantes. Entretanto, embora estes fatores participem na etiopatogenia das RRE, não são capazes de explicar completamente as diferenças interindividuais observadas. Por outro lado,

constata-se uma escassez de informações sobre o papel da resposta imune do paciente na patogênese das RRE. Diante da alta prevalência das RRE após reimplantes de dentes permanentes e das consequências que a perda precoce dos incisivos centrais superiores (dentes mais afetados na grande maioria dos casos) pode acarretar para a faixa etária mais acometida, crianças e adolescentes, é de grande relevância a compreensão da patogênese e dos fatores de susceptibilidade envolvidos no desenvolvimento de formas graves destes quadros. Esse conhecimento representa um primeiro passo para que se possam desenvolver tratamentos mais específicos que, em última instância, viabilizem e favoreçam a cicatrização dos dentes avulsionados, mesmo quando reimplantados tardiamente.

2-REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mecanismos celulares e moleculares da reabsorção dos tecidos mineralizados

Reabsorção é o termo utilizado na literatura médica e odontológica, para definir o processo pelo qual tecidos mineralizados formados são destruídos pela ação de células especializadas, os clastos, que dissolvem os componentes mineralizados, degradam a matriz orgânica e posteriormente eliminam seus subprodutos através do sistema sanguíneo e linfático (BECKS e MARSHALL, 1932). Em condições fisiológicas normais a reabsorção dos tecidos mineralizados depende do balanço entre fatores sistêmicos e locais, produzidos constitutivamente ou em resposta a estímulos externos, que atuam estimulando ou inibindo a atividade clástica. Entre os fatores locais, as citocinas do eixo: receptor ativador do fator nuclear kappa (RANK)- ligante do receptor de ativação do fator nuclear kappa (RANKL) – osteoprotegerina (OPG), desempenham um papel central uma vez que medeiam as interações celulares necessárias para a formação e atividade dos osteoclastos (OCLs). O receptor RANK (TNFRSF11A) é uma proteína de membrana do tipo I expressa pelos OCLs, seus precursores e pelas células dendríticas. RANKL (TNFSF11) é uma proteína tipo II homotrimérica que pode se apresentar na sua forma transmembrana expressa por células da linhagem osteoblástica ou como uma proteína solúvel (BOYCE e XING, 2007). A interação de RANKL com RANK ativa a via de sinalização do fator associado ao fator de necrose tumoral 6 (TRAF6) induzindo a expressão de genes associados à diferenciação e função dos OCLs (BOYCE et al., 2013). A interação RANK-RANKL é regulada negativamente pela OPG (TNFRSF11B) uma proteína solúvel que se liga ao RANKL, diminuindo o número de moléculas disponíveis para interação com RANK e, consequentemente, inibindo a osteoclastogênese (BOYCE e XING, 2007). A sua expressão, de um modo geral é regulada pela maioria dos fatores que induzem a expressão de RANKL sendo que a regulação positiva da RANKL é associada a uma menor indução da OPG e vice-versa de modo que a proporção de RANKL/OPG é determinante da gênese e atividade dos OCLs (BOYLE et al., 2003).

Um dos primeiros eventos no processo de reabsorção é o recrutamento e diferenciação de precursores dos OCLs, pertencentes à linhagem mielóide de fagócitos mononucleares, presentes na circulação (BURGER et al., 1984). Nesta etapa, a ligação do fator estimulador de colônias para monócitos (M-CSF) em seus receptores, expressos pelos precursores dos OCLs, tem uma atuação central no comprometimento e sobrevivência destas células, principalmente através da indução de expressão de RANK (TAKAHASHI et al., 1991). Em condições fisiológicas o M-CSF é produzido pelos osteoblastos e outras células do estroma ósseo sob o estímulo de

mediadores sistêmicos, como por exemplo o aumento dos níveis circulantes do hormônio da paratireóide ou paratormônio (PTH) (HATTERSLEY et al,1991). Além da expressão aumentada de M-CSF no microambiente ósseo, quimiocinas como o fator quimiotático para neutrófilos (IL-8/CXCL8), a proteína quimiotática para monócitos (MCP-1/CCL2), a proteína inflamatória para macrófago - 1α (MIP-1 α /CCL3) e fator quimiotático para linfócitos T (RANTES/CCL5), desempenham um importante papel durante o recrutamento, diferenciação e fusão das células clásticas, além de atuarem alterando a função e propriedades dos OCLs maduros (SCHEVEN et al., 1999; CHOI et al., 2000; HAN et al., 2001; BENDRE et al., 2003; OKAMATSU et al., 2004; YANO et al., 2005).

O estágio final de diferenciação da célula clástica depende de seu acoplamento à superfície óssea após a remoção da camada osteóide e exposição dos cristais de hidroxiapatita (PIERCE, 1989). A remoção da camada osteóide pode se dar através de sua digestão enzimática pela ação de metaloproteinases (MMPs) produzidas pelos osteoblastos ou pelos próprios OCLs, como por exemplo a metaloproteinase 9 (MMP9), na presença de níveis aumentados de PTH, ou da plasmina presente no infiltrado inflamatório (MEIKLE et al., 1992). A proximidade da célula clástica com a superfície óssea desnuda permite uma firme adesão mediada por um anel de proteínas contráteis, semelhantes à actina, interligadas às integrinas $\alpha_v\beta_3$ da membrana celular clástica que se ligam firmemente às proteínas da matriz óssea como a osteopontina, a sialoproteína e o colágeno tipo I (SHIGEYAMA et al., 1996). Essa união firme e estável é acompanhada da formação de uma borda pregueada, ou borda em escova, voltada para a interface com o tecido ósseo e caracterizada por várias projeções da membrana citoplasmática (PIERCE et al., 1991). Durante o processo de reabsorção os OCLs ficam localizados em depressões da matriz óssea calcificada, escavadas pelo próprio processo de reabsorção - as lacunas de Howship. Neste compartimento extracelular isolado os OCLs inicialmente solubilizam a fase mineralizada pela ação de ácidos secretados através das bordas pregueadas (PIERCE et al., 1991). A exposição da fase orgânica do osso permite que esta seja degradada por enzimas proteolíticas. Como na lacuna de reabsorção o pH varia entre 4,5 a 5, neste compartimento as catepsinas são as responsáveis pela degradação do colágeno e dos proteoglicanos que compõem a matriz orgânica do tecido mineralizado uma vez que atuam em pH ácido (EVERTS et al., 1992; OKAMURA et al., 1993) Os fragmentos de colágeno são posteriormente hidrolisados por outras enzimas como as colagenases MMP9 e metaloproteinase de matriz 2 (MMP2) que atuam mais próximas à superfície óssea reabsorvida onde o pH é mais próximo do neutro devido ao efeito tampão exercido pelos próprios íons mineralizados (OKADA et al., 1995; DELAISSÉ et al., 2000). A degradação tanto da porção orgânica quanto da

inorgânica não se completa na lacuna de Howship. Microfragmentos são fagocitados e processados pelos OCLs na forma de vacúolos citoplasmáticos e seus produtos finais são liberados no meio tecidual pelo processo conhecido como transcitose (SALO et al., 1997). A atividade clástica cessa quando as condições ideais para a sua atividade sofrem alterações significativas como por exemplo o aumento do pH tecidual. O pH alcalino impede a ação enzimática necessária para a dissolução dos tecidos mineralizados, em especial das catepsinas e das fosfatases ácidas (FALLON, 1984). Além disso, o próprio processo de degradação da matriz óssea libera fatores como o fator de crescimento transformante beta (TGF- β) que inibem a proliferação e fusão dos pré-OCLs entre outras ações (CHENU et al., 1988).

No contexto de um processo inflamatório, além do eixo RANK-RANKL-OPG e M-CSF, várias citocinas podem atuar influenciando diretamente a diferenciação e função dos OCLs, ou indiretamente através da modulação da expressão das citocinas do eixo RANK-RANKL-OPG (ZUPAN et al., 2013). As citocinas pro-inflamatórias da família da interleucina 1 (IL-1), interleucinas 1 alfa e beta (IL-1 α e IL-1 β), são potentes estimuladoras da reabsorção óssea com efeitos diretos na proliferação e diferenciação dos precursores dos OCLs e na atividades dos OCLs maduros (NAKAMURA e JIMI, 2006). Além disso, apresentam efeitos indiretos estimulando a síntese de RANKL e de prostaglandinas (PGE2) (SATO et al., 1986; MA et al., 2004). Além da IL-1, as citocinas da família do fator de necrose tumoral (TNF), fator de necrose tumoral alfa e beta (TNF α e TNF β) também promovem reabsorção óssea atuando principalmente na osteoclastogênese (LAM et al., 2000; KOBAYASHI et al., 2000). Outras citocinas liberadas durante o processo inflamatório como por exemplo a interleucina 6 (IL-6), interleucina 17 (IL-17), interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10), interferon gama (INF γ) e antagonista de receptor da IL-1 (IL-1RA) também podem interferir, direta ou indiretamente, na atividade de reabsorção. Embora os resultados relativos ao papel da IL-6 na reabsorção dos tecidos mineralizados sejam variados, evidências sugerem que esta citocina tem um papel predominantemente estimulador da atividade de reabsorção uma vez que ela foi capaz de induzir o crescimento e diferenciação dos precursores dos OCLs estimulando a síntese de RANKL/OPG e de PGE2 (PALMQVIST et al., 2002; LIU et al., 2005), ou através de uma via independente de RANKL (KUDO et al., 2003). De forma semelhante a IL-17A tem um importante efeito estimulador de osteoclastogênese através do aumento da síntese de RANKL e de PGE, efeito este potencializado pelo TNF α (WEAVER et al., 2007). IL-4 tem efeito regulador sobre a reabsorção óssea através de sua atuação nos osteoblastos, diminuindo a remodelação do tecido ósseo (OKADA, 1998), aumentando a expressão de OPG em detrimento de RANKL (PALMQVIST et al., 2006), e diminuindo a síntese de prostaglandina 2 (PGE2) induzida pela

IL-1 (ONOE et al., 1996). Além disso, ela atua diminuindo a maturação de pré-OCLs (MANGASHETTI et al., 2005). A IL-10 atua regulando a reabsorção óssea através do controle da osteoclastogênese. Este efeito inibidor pode ser direto sobre os precursores dos OCLs, através da menor expressão e translocação de fatores de transcrição determinantes da osteoclastogênese (EVANS et al., 2007; MOHAMED et al., 2007). Além disso, a IL-10 pode atuar indiretamente no controle da osteoclastogênese através da inibição da expressão de RANKL e aumento da expressão de OPG (LIU et al., 2006). IFN γ exerce diferentes papéis na atividade de reabsorção, dependendo do contexto em que a mesma acontece. Evidências experimentais sugerem que durante a remodelação óssea fisiológica seus efeitos são antirreabsortivos, devido à sua atuação nos pré-OCLs inibindo a via de sinalização da RANK (TAKAYANAGI et al., 2000) e ao bloqueio da osteoclastogênese estimulada pela IL-1 β , PTH e 1,25 diidroxivitamina D₃ (TAKAHASHI et al., 1986). Entretanto, os efeitos do IFN γ *in vivo* são controversos uma vez que existem relatos de efeitos tanto inibitórios (MANOURY-SCHWARTZ et al., 1997) quanto estimulatórios (TAKAYANAGI et al., 2000; MANN et al., 1997). IL-1RA se liga ao receptor IL-1R1 sem causar qualquer efeito biológico direto mas inibindo competitivamente as respostas mediadas pela IL-1 α e IL-1 β (AREND, 2002). IL-1RA, contudo, não interfere nos efeitos de outros mediadores, como por exemplo o PTH e a 1,25 diidroxivitamina D₃, tampouco tem ação direta sobre OCLs (DAYER et al., 2002). Outro grupo de fatores locais que merecem uma consideração especial são as MMPs, uma família de 26 endopeptidases, cálcio e zinco dependentes, capazes de degradar componentes proteicos da matriz extracelular (MEC). As MMPs tem um papel central no processo de reabsorção participando ativamente da remoção do tecido osteóide, o que permite o acoplamento da célula clástica, e durante a degradação da parte orgânica da matriz óssea (DELAISSÉ et al., 2000; 2003). Apesar de compartilharem a mesma topologia estrutural, apresentam particularidades de acordo com seu substrato específico sendo que o grupo das gelatinases é composto pelas MMP-2 e MMP-9. No microambiente ósseo, as gelatinases podem ser produzidas por fibroblastos, células endoteliais, monócitos/macrófagos, osteoblastos e condrócitos. Além disso, MMP9 também é secretada por células clásticas desde as fases iniciais de diferenciação e participa ativamente da migração e acoplamento da célula clástica. MMP-2 e MMP-9 desempenham um importante papel nas várias etapas do processo de reabsorção óssea, uma vez que são capazes de degradar colágeno íntegro ou desnaturado (WUCHERPFENNING et al., 1994; OKADA et al., 1995; ZHAO et al., 1999; PEREZ-AMODIO et al., 2004; BOUMAH et al., 2005; INOUE et al., 2006), além de participarem do processamento de proteínas não colagênicas, como por exemplo os fatores de crescimento e outras citocinas envolvidas no recrutamento e crescimento tanto dos OCLs quanto dos

osteoblastos (DALLAS et al., 1995; ENGSING et al, 2009; MOSIG et al, 2007; WANG et al., 2006). A expressão das MMPs é altamente regulada no organismo e vários fatores estão envolvidos, entre eles os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). TIMPs são proteínas pequenas (21-28 kDa) multifuncionais que regulam a função das MMPs tanto ao nível da sua ativação, quanto na sua capacidade para hidrolisar um determinado substrato. Os TIMPs se ligam às pró-MMPs por meio da ligação de seu domínio C-terminal com o domínio hemopexina da pró-enzima. Essa interação é relativamente específica, sendo que na maioria das células, MMP-9 é secretada como um complexo com o TIMP-1, ao passo que a TIMP-2 está associada à MMP2 (NAGASE et al., 2006; GEURTS et al., 2011).

2.2 Mecanismos celulares e moleculares das reabsorções dentárias

Na cavidade oral, três tecidos são passíveis de serem reabsorvidos : osso alveolar, cemento e dentina. Entretanto, embora possuam a mesma origem mesenquimal e componentes estruturais básicos similares - colágeno e hidroxiapatita, diferem na susceptibilidade à reabsorção. Enquanto o osso alveolar é constantemente reabsorvido durante o processo fisiológico de remodelação óssea, necessário para o crescimento e manutenção dos maxilares, bem como para a homeostasia de cálcio e fosfato séricos, os tecidos dentários mineralizados, cemento e dentina, não são incluídos neste processo de remodelação fisiológica mesmo estando tão próximos- a espessura daínda que o . Dois fatores principais são responsáveis pela manutenção da integridade da estrutura radicular: os Restos Epiteliais de Malassez presentes no LP e o cemento radicular . Os Restos Epiteliais de Malassez são uma rica fonte de fator de crescimento epidérmico (EGF), um potente estimulador de osteoclasia (ZHU et al., 2007), e desempenham um importante papel impedindo a anquilose alvéolo-dentária (LINDSKOG et al, 1988b). O cemento dentário é um tecido conjuntivo duro, muito semelhante ao osso, que recobre as raízes do dente e tem como principal função a inserção das fibras do ligamento periodontal. Sua menor susceptibilidade à reabsorção pode ser atribuída à sua camada mais externa, constituída por cementoblastos que não respondem ao paratormônio - PTH, um potente mediador da reabsorção óssea (LINDSKOG et al, 1987a). Além, disso, a camada mais interna, altamente mineralizada, com cerca de 10µm de espessura, descrita como camada hialina de Hoper-well-Smith ou como cemento intermediário, também é altamente resistente à atividade clástica. Um estudo do seu desenvolvimento sugere que ela não é nem dentina e nem cemento; ao contrário, uma forma de esmalte secretado pelas células da bainha epitelial radicular e sua função seria a união do cemento com a dentina atuando como uma barreira efetiva ao selar externamente a

abertura dos túbulos dentinários no seu contato com a camada cementoblástica (HAMMMARSTRÖM e LINDSKOG, 1985). Entretanto, mesmo sendo mais resistente à atividade de reabsorção, o cemento radicular apresenta capacidade de reparo, principalmente na sua porção mais apical, aonde é caracterizado como cemento celular, devido ao fato de sua deposição ser contínua ao longo da vida. Esta capacidade de reparo, entretanto, depende da manutenção de remanescentes viáveis da própria camada cementoblásticas ou de células progenitoras presentes no LP (BOSSHARDT e SELVIG, 1997).

Considerando-se o fato de que as estruturas dentárias não sofrem uma remodelação fisiológica, as reabsorções dentárias são sempre consideradas um processo patológico pois se iniciam a partir de estímulos agressores externos que causam a lesão ou remoção das estruturas que protegem a superfície radicular. A única situação de reabsorção dentária considerada fisiológica ocorre durante a esfoliação dos dentes decíduos, uma vez que a remoção das camadas que protegem as superfícies radiculares se inicia a partir de estímulos endógenos como por exemplo a apoptose dos cementoblastos e odontoblastos do dente decíduo (HAROKOPAKIS-HAJISHENGALLIS, 2007).

Os mecanismos celulares de reabsorção radicular são bastante semelhantes aos da reabsorção óssea, diferindo apenas nos seus respectivos substratos, resultando da elaborada interação entre células do estroma conjuntivo e inflamatórias que, coletivamente organizam a atividade de hormônios, enzimas, citocinas, e outros mediadores (PIERCE, 1989; SASAKI, 2003). As células clásticas envolvidas nas reabsorções radiculares, os odontoclastos, também são células gigantes, multinucleadas com numerosos lisossomas e mitocôndrias e embora possam ser menores e apresentar menos núcleos, são, morfológica e funcionalmente, semelhantes aos OCLs (PIERCE, 1991; OSHIRO et al., 2001; SASAKI, 2003).

A maioria das informações acerca das reabsorções radiculares advém de estudos relativos à esfoliação de dentes decíduos. Evidências indicam que fatores estimuladores de odontoclastogênese tais como a proteína relacionada ao paratormônio (PTHrP), IL-1, TNF α , M-CSF, MCP-1 α , RANKL e MMP9, liberadas no âmbito do LP do dente decíduo resultam na fusão e ativação de um grande número de odontoclastos responsáveis pela reabsorção da raiz do dente decíduo (HAROKOPAKIS-HAJISHENGALLIS, 2007). O estudo das reabsorções radiculares externas apicais (RREA) decorrentes da movimentação ortodôntica também tem contribuído para a compreensão dos mecanismos imunopatológicos envolvidos nas reabsorções radiculares. Sabe-se que há um aumento da expressão de citocinas pro-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF α , RANKL) e de outros fatores locais mediadores da atividade clástica (PGE2, MMPs) no LP e fluido do sulco gengival durante a movimentação dentária ortodôntica (WISE e KING, 2008).

Esses mediadores também estão associados aos quadros avançados de RREA (HARTSFIELD, 2009).

A etiopatogenia das REE pós-traumáticas envolve estímulos que atuam em dois momentos distintos: o recrutamento e a instalação de células clásticas na superfície da raiz e a manutenção de sua atividade reabsortiva. Os fatores desencadeantes que estabelecem condições propícias à diferenciação e atividade clástica na superfície radicular são a lesão tecidual representada pela ruptura total das fibras periodontais e remoção mecânica da camada cementoblástica durante a exarticulação do dente de seu alvéolo, no momento do trauma. (HAMMARSTRÖM e LINDSKOG, 1992). Posteriormente diferentes fatores atuam estimulando continuamente a formação e ativação dos odontoclastos e fazendo que a atividade de reabsorção se torne progressiva (SHAW e GRIFFIN, 1981). Estudos experimentais demonstraram que sob condições ideais, isto é, quando a vitalidade da membrana periodontal não foi comprometida, imediatamente após o reimplante o processo de reparo se inicia envolvendo uma fase de remoção de restos teciduais e hemorrágicos pela ação de macrófagos e osteoclastos. Na ausência de contaminação bacteriana, esta fase é seguida pelo estágio de proliferação e secreção e se dá às custas de células tronco presentes no ligamento periodontal, que se diferenciam em novos cementoblastos e fibroblastos e são responsáveis pela reestruturação da arquitetura normal do ligamento periodontal e pela neoformação de cemento nas lacunas de reabsorção, geralmente em um período de 14 dias após o reimplante (LINDSKOG et al., 1987b; EHNEVID et al., 1993). Entretanto, se houver necrose pulpar e consequente contaminação do canal radicular, as camadas cementoblástica e de cemento intermediário, tendo sido atingidas pela reabsorção da superfície radicular durante as fases iniciais de reparo do LP, acabam por expor os túbulos dentinários, propiciando uma via de acesso para bactérias e suas toxinas atingirem a superfície externa da raiz (ANDREASEN et al., 1981d). A presença da infecção modifica o curso do processo de reparo do LP, amplificando o processo inflamatório e mantendo contínuo o estímulo para a formação e ativação dos odontoclastos. Esta sequência de eventos foi denominada reabsorção radicular externa inflamatória RREI, por Andreasen e Hjørting-Hansen (1966a, 1966b). A participação bacteriana na etiopatogenia da RREI foi demonstrada experimentalmente (ANDREASEN, 1981a; ANDREASEN, 1981b, TROPE et al., 1992) e comprovada em estudos clínicos, especialmente após início tardio do tratamento endodôntico radical (ANDREASEN e HJØRTING-HANSEN, 1966a; COCCIA, 1980; ANDREASEN et al., 1995b; CHAPPUIS e von ARX, 2005; PETROVIC et al., 2010; WERDER et al., 2011). Histologicamente, as RREI são caracterizadas pela erosão do cemento e dentina, com muitas Lacunas de Howship preenchidas por odontoclastos e intenso infiltrado inflamatório com linfócitos, plasmócitos e neutrófilos

polimorfonucleares (PMN) no LP vizinho (ANDREASEN, 1980b) (Fig.1). Considerando-se estes achados, pode-se inferir que o principal mecanismo de indução da **RREI** esteja relacionado com a capacidade das endotoxinas da parede bacteriana de promover a liberação de fatores desencadeadores da atividade osteoclástica à semelhança do que ocorre na reabsorção óssea periapical em resposta à infecção do canal radicular (NE, 1999; GRAVES et al., 2011). Entretanto, não existem estudos na literatura sobre a participação das citocinas e outros possíveis fatores locais na modulação da RREI.

A cicatrização de dentes reimplantados nos quais grandes áreas do LP foram removidas ou necrosadas é vista como uma fusão entre tecidos mineralizados da raiz e o osso alveolar, seguida de uma substituição gradual dos tecidos dentários por tecido ósseo (ANDREASEN, 1980a; ANDREASEN 1981c; ANDREASEN e KRISTERSON, 1981; LINDSKOG et al., 1988a; NISHIOKA et al.,1998). Este processo foi primeiramente descrito por Andreasen & Hjørting-Hansen (1966a, 1966b) que denominaram-no reabsorção radicular externa por substituição (RRES) (Fig.2). Estudos experimentais posteriores confirmaram que uma lesão extensa do ligamento periodontal leva à perda de vitalidade das células precursoras dos fibroblastos e cementoblastos, resultando no repovoamento da superfície radicular por células tronco derivadas da medula do osso alveolar (McCULLOCH et al, 1987; PITARU et al., 1994). Os mecanismos reguladores deste processo, ou seja, os fatores de manutenção da RRES, ainda não são conhecidos plenos e detalhadamente. Acredita-se que a superfície dentinária radicular, ao perder a camada cementoblástica e ser colonizada por osteoblastos e osteoclastos que normalmente recobrem o osso medular, passam a integrar o processo de remodelação fisiológica do osso alveolar tendo sido denominada também de reabsorção radicular endóstea (HAMMARSTRÖM et al., 1989). Por este motivo, a evolução da RRES é imprevisível, bem como o tempo de permanência do dente na cavidade oral, uma vez que está sujeita aos fatores moduladores da remodelação do osso alveolar (HAMMARSTRÖM e LINDSKOG, 1992; ANDREASEN e ANDREASEN, 1992). Estudos experimentais demonstraram que durante este processo, as próprias proteínas liberadas da matriz dentinária podem desempenhar um papel ativo na modulação da atividade de reabsorção estimulando a síntese de IL-1 β e TNF- α (SILVA et al, 2004a; 2004b). Além disso, um aumento na expressão de TNF α foi observado nas lacunas de reabsorção após reimplantes de molares de ratos (REGO et al., 2011). Neste mesmo estudo, células da linhagem osteoblástica e cementoblástica tratadas com lipopolissacarídeos (LPS) aumentaram a expressão de *mRNA* TNF α , que por sua vez determinou a uma maior expressão de *mRNA* RANKL. Evidências clínicas sugeriram um papel imunogênico das frações não colagênicas da dentina uma vez que pacientes portadores de RRES apresentaram níveis séricos

elevados de imunoglobulina G (IgG) reativas ao extrato dentinário humano e suas frações, quando comparados com pacientes sem reabsorção (HIDALGO et al., 2005). Mais recentemente foi observada uma associação entre o perfil imunológico predominantemente Th2, representado por pacientes atópicos, e o melhor prognóstico dos reimplantes, independentemente do manejo e tratamento inicial dos dentes avulsionados (ROSKAMP et al., 2009, ROSKAMP et al., 2011).

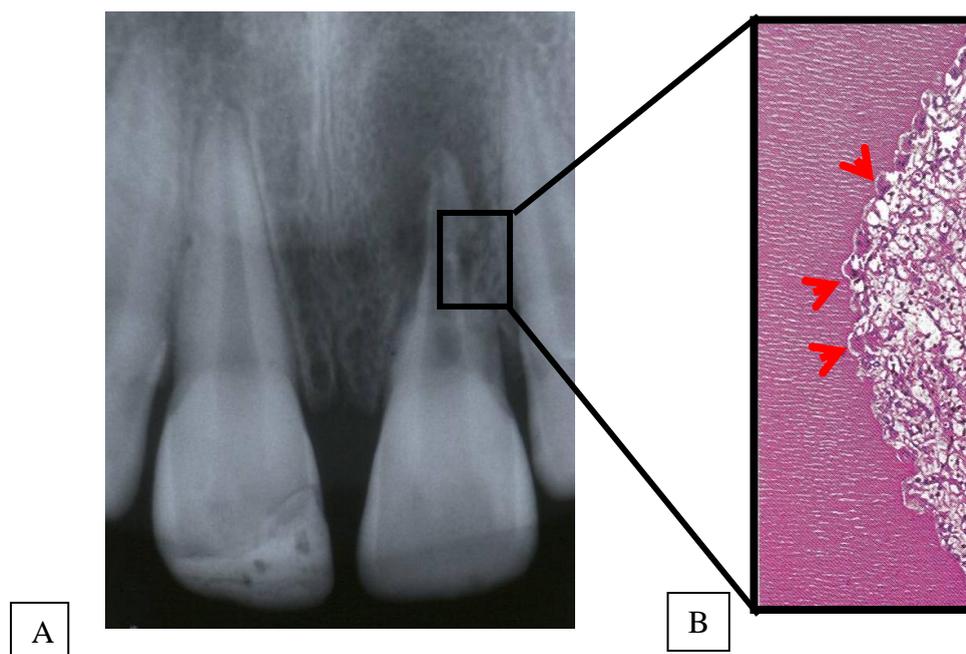


Figura 1: – Aspecto radiográfico e histopatológico da RREI A- Aspecto radiográfico da RREI com áreas radiolúcidas irregulares ao longo da superfície radicular e osso alveolar adjacente. Fonte: Arquivo da CTD-FO-UFMG, 2014. B - Aspecto histopatológico da RREI com áreas de erosão na dentina, com várias lacunas de Howship preenchidas por odontoclastos (setas vermelhas) e intenso infiltrado inflamatório no ligamento periodontal adjacente (HE 10X) Fonte: Consolaro, 2012.

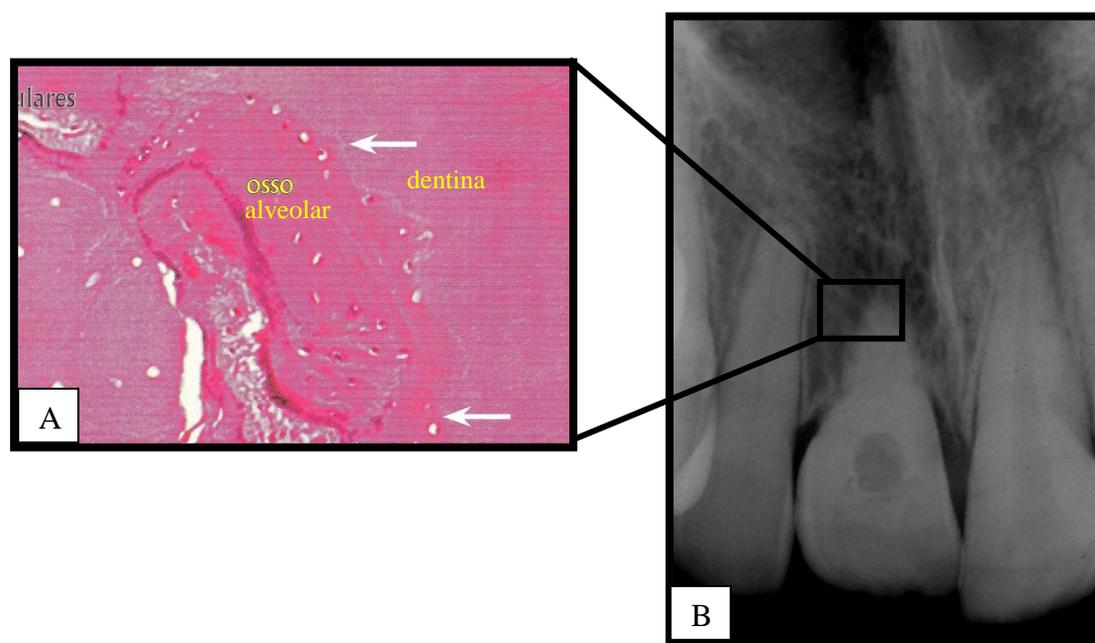


Figura 2: Aspecto histopatológico e radiográfico da RRES: A- Aspecto histopatológico da RRES com áreas de dentina em contato direto com o osso alveolar, margeadas por osteoblastos (setas brancas)(HE, 25X). Fonte: Consolaro 2012. B- Aspecto radiográfico de RRES, no elemento dentário 11 com perda do espaço do ligamento periodontal, irregularidade da superfície radicular e imbricamento do osso alveolar na estrutura dentaria. Fonte: Arquivo da CTD-FO-UFMG, 2014.

2.3 Polimorfismos genéticos

Considerando-se a importância das citocinas na biologia dos tecidos ósseos e nos processos de reabsorção patológica dos tecidos mineralizados, variações na sua expressão podem determinar diferentes respostas inflamatórias dos indivíduos frente a um estímulo padrão. Nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado que polimorfismos em genes que codificam para as citocinas podem influenciar na suscetibilidade a doenças, uma vez que podem alterar a taxa de transcrição gênica, produzir proteínas incompletas ou inativas (CHORLEY et al., 2008), sendo considerados como fatores de risco para várias desordens da cavidade oral (DUTRA et al., 2009, KUBISTOVA et al., 2009; GREGERSEN e OLSSON, 2009). Polimorfismo genético é a denominação dada à coexistência de mais de uma forma variante de um gene num dado locus, na frequência acima de 1-2%, na constituição genética de uma população. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são sítios no genoma onde a sequência de ácido desoxirribonucleico (DNA) de uma porcentagem de indivíduos da população difere por uma única base e representam a forma mais comum de variação do genoma humano (De NARDIN, 2009). De especial interesse para o presente estudo são os SNPs nos genes que codificam para fatores locais mediadores do processo de reabsorção, como a família da IL-1, o eixo RANK-RANKL-OPG, a IL-10 e as MMPs, uma vez que tem sido amplamente estudados em relação ao seu papel na evolução de patologias que envolvem um aumento na atividade osteolítica.

2.3.1 Polimorfismos dos genes que codificam para a família IL-1

Os genes que codificam para os membros da família IL-1 situam-se no braço longo do cromossomo 2q13-14. A variante genética mais estudada no gene *IL1A* é a substituição de uma base C por uma T na posição -889 na região promotora, SNP rs 1800587. Este polimorfismo foi inicialmente associado à maior atividade de transcrição do gene e consequente aumento dos níveis plasmáticos da proteína (DOMINICI et al., 2002). Estudos posteriores demonstraram que este SNP é um marcador para outro SNP rs17561 (+4845G/T), uma vez que estão em desequilíbrio de ligação em várias populações, com exceção dos Afro-Americanos (KAWAGUCHI et al., 2007). Os portadores do alelo polimórfico no SNP rs17561 apresentam maior eficiência na clivagem do precursor inativo da IL-1 α , facilitando sua expressão pela célula (KAWAGUCHI et al., 2007). O SNP rs 1143634 situa-se na posição +3493 no 5^o. exon do gene

IL1B sendo que a variante alélica polimórfica T foi relacionada com um aumento de até 4 vezes na produção de IL1 β (POCIOT et al., 1992; CORK et al., 1995; ENGBRETSON et al., 1999).

O gene *IL1RN* que codifica para IL-1RA contém um SNP rs 419598, representado pela substituição sinônima de uma timina por uma citosina no locus +2018 do 2º exon. Embora este polimorfismo não altere a sequência de aminoácidos no transcrito codificado, está em desequilíbrio de ligação com outro polimorfismo de variação do número de repetições in tandem (VNTR) situado no intron 2 sendo que a presença do alelo polimórfico C, no SNP rs 419598 é um marcador para a ocorrência da variante com 2 repetições no polimorfismo de microsatélite, (CLAY et al., 1996) que, por sua vez, foi associado a um aumento na produção da proteína (DANIS et al., 1995; HURME e SANTILLA, 1998).

Polimorfismos nos genes que codificam para as citocinas da família IL-1 tem sido amplamente estudados em relação ao seu papel na evolução de patologias orais como por exemplo as reabsorções radiculares externas apicais (RREA) após movimentação ortodôntica com resultados controversos. Em dentes vitais, uma menor susceptibilidade à RREA foi observada fortemente associada à presença do alelo polimórfico T no SNP *IL1B* rs 1143634 (AL-QAWASMI et al., 2003b, BASTOS LAGES et al., 2009, IGLESIAS-LINARES et al., 2012b). Este efeito foi creditado à participação do tecido pulpar apical vital na produção aumentada de IL-1 β resultando numa maior reabsorção do osso alveolar. A taxa de remodelação óssea aumentada por sua vez facilitaria a movimentação dentária e diminuiria o stress sobre a estrutura radicular e, conseqüentemente, a RREA. Tal correlação, entretanto não pôde ser confirmada por outros estudos (GÜLDEN et al., 2009; TOMOYASU et al., 2009; LINHARTOVA et al., 2013; PEREIRA et al., 2013, WU et al., 2013).

Além disso, uma correlação oposta foi observada em dentes tratados endodonticamente que foram submetidos à movimentação ortodôntica, ou seja, a presença do alelo T determinou uma maior susceptibilidade a RREA (IGLESIAS-LINARES et al., 2012a, IGLESIAS-LINARES et al., 2012c). Este efeito contrário da presença do alelo T nos dentes tratados endodonticamente, foi explicado pela pré-existência de fatores pró-reabsorptivos na região periapical relacionadas às condições prévias que levaram ao TER (necrose ou inflamação pulpar) ou induzidas pelo próprio TER (IGLESIAS-LINARES et al., 2012a, IGLESIAS-LINARES et al., 2012c).

A associação do SNP *IL1A* rs 1800587 com RREA foi relatada em um só estudo realizado na Alemanha (GÜLDEN et al., 2009), mas não foi observada em outras populações caucasianas (IGLESIAS-LINARES et al., 2012b; LINHARTOVA et al., 2013). Relatos mais recentes também sugeriram que pacientes portadores do alelo polimórfico C no SNP *IL1RN* rs

419598 apresentaram menor susceptibilidade à RREA após movimentação ortodôntica de dentes vitais ou tratados endodonticamente (IGLESIAS-LINARES et al., 2012b, IGLESIAS-LINARES et al., 2013; LINHARTOVA et al., 2013). SNPs nos genes que codificam para a família IL-1 também foram avaliados em relação à evolução e cicatrização da periodontite periapical com resultados controversos (De SA et al., 2007; SIQUEIRA JÚNIOR et al., 2009; MORSANI et al., 2011; AMAYA et al., 2013).

2.3.2 Polimorfismos no Gene IL10

O gene que codifica a IL-10 humana está localizado no cromossomo 1q31-32 (ESKDALE et al., 1998) e é altamente polimórfico na sua região promotora. Existem evidências de que o SNP rs 1800896, localizado no locus -1082 da região promotora tem um importante efeito na expressão da proteína uma vez que a substituição de uma base A pela G aumenta a afinidade com o fator de transcrição Sp1 aumentando desta forma a expressão gênica (TURNER et al., 1997; LARSSON et al., 2011). Tendo em vista o importante papel da IL-10 na regulação da reabsorção dos tecidos mineralizados e considerando que a modulação dos níveis da proteína pode se dar a nível genético, a influência deste SNP na susceptibilidade à reabsorção patológica de tecido ósseo tem sido amplamente estudada na doença periodontal (CULINAN et al., 2008; LARSSON et al., 2011; GUROL et al., 2011; LOO et al., 2012; JARADAT et al., 2012), na perimplantite (GUROL et al., 2011; PIGOSSI et al., 2012); artrite reumatóide (ZHANG et al., 2011) e hérnia de disco (LIN et al., 2011).

2.3.3 Polimorfismos nos Genes que codificam para o eixo OPG-RANKL-RANK

O gene *TNFRSF11B* que codifica para a OPG é um gene de cópia única com 5 exons e se situa no cromossomo 8q24.1 (MORINAGA et al., 1998). O SNP rs 2073618 situa-se no locus +1181 no exon 1, consistindo troca de uma base G para C levando à mudança de um aminoácido de característica básica, a lisina (AAG), para um aminoácido polar não carregado, a aspargina (AAC) na sequência sinal influenciando o tráfego da proteína (WYNNE et al., 2002). O gene *TNFSF11* possui 8 exons, situa-se no cromossomo 13q14 e codifica para RANKL. O SNP rs 2277438 consiste na troca de uma base A por G (DONG et al., 2009). O gene *TNFRSF11A* que codifica para RANK situado no cromossomo 18q22, possui 12 exons e apresenta um polimorfismo localizado no intron 1 representado por uma substituição de base C por G (KIM et al., 2007).

Devido ao papel central do eixo RANK-RANKL-OPG no metabolismo ósseo e na biologia dos OCLs, variações nos genes que codificam para estas citocinas têm sido amplamente exploradas quanto à uma possível associação com doenças que envolvem atividade osteolítica patológica, tais como a osteoporose (LEE et al., 2010), a doença de Paget (CHUNG e Van HUL, 2012), artrite reumatóide (ASSMANN et al., 2010) e espondilite anquilosante (HUANG et al., 2011). SNPs nestes genes também foram avaliados em relação a doenças orais que envolvem reabsorções patológicas dos tecidos dentários e do osso alveolar com resultados diferentes. Existem evidências de que a osteólise expansiva familiar (OEF), uma desordem caracterizada por lesões osteolíticas dos ossos longos, que também pode resultar em reabsorção espontânea de dentes e perda de dentição, é causada por mutações no gene que codifica para RANK (HUGHES et al., 2000). A susceptibilidade para desenvolver RREA após terapia ortodôntica também foi correlacionada com variações no gene *TNFSRF11A* que codifica para RANK (AL-QAWASMI et al., 2003a) e com o SNP rs 2073618 no gene *TNFSRF11B* que codifica para a OPG (HARTSFIELD, 2009). Esta associação também foi demonstrada em relação à periodontite agressiva (PARK et al., 2008) à peri-implantite (KADKHODAZADEH et al., 2012) e relacionada à osteonecrose mandibular induzida pelo uso de bifosfonados (KATZ et al., 2011).

2.3.4 Polimorfismos nos genes *MMP-2* e *MMP-9*

O gene que codifica para a MMP2 localiza-se no cromossomo 16q21 e variações genéticas tem sido relacionado com a modulação de sua expressão. Dois polimorfismos na região promotora, rs243865 (-1306C/T) e rs2285053 (-735C/T), resultam na menor expressão da proteína devido à perda do sítio de ligação específico para o fator de transcrição Sp1 (PRICE et al., 2001). Outra troca de base G para A, situado no locus -1575 (rs 243866) também impede a ligação do receptor de estrogênio diminuindo a resposta transcricional do gene (HARENDZA et al., 2003). Entre os vários polimorfismos apresentados pelo gene *MMP-9*, localizado no cromossomo 20, o SNP rs 3918242, localizado no locus -1562 de sua região promotora, constitui-se na troca de uma base C por T e tem sido associado a uma maior atividade de transcrição uma vez que o alelo C tem maior afinidade para a ligação de uma proteína silenciadora (MEDLEY et al., 2004). A variante alélica T também foi associada com níveis plasmáticos elevados de MMP9 (BLANKENBERG et al., 2003).

Polimorfismos que interferem na taxa de transcrição gênica destas enzimas tem sido amplamente pesquisados quanto ao seu papel na maior ou menor susceptibilidade a doenças nas quais a alteração dos níveis teciduais e plasmáticos das MMPs podem determinar uma maior destruição tecidual como, por exemplo, a artrite reumatóide (RODRIGUEZ-LOPEZ et al., 2006;

JACQ et al., 2008), câncer (YU et al., 2004; ZHOU et al., 2011; BEEGHY-FADIEL et al., 2009) e psoríase (VASKU et al., 2002). Estes polimorfismos também foram associados à patologias orais como osteonecrose mandibular induzida pelo uso de bifosfonados (KATZ et al., 2011), cáries (TANURE et al., 2012) e lesões periapicais (MENEZES-SILVA et al., 2012).

2.4. O Papel de determinantes demográficos e clínicos na RRE após reimplantes de dentes permanentes

Vários estudos clínicos e experimentais avaliaram o papel de fatores demográficos e clínicos, relacionados ao manejo e tratamento do dente avulsionado, na ocorrência e evolução das RRE pós-traumáticas. Idades entre 6 e 7 anos (ANDREASEN e HJØRTING-HANSEN, 1966a) e estágios iniciais de rizogênese no momento do trauma, foram relacionadas à maior incidência de RREI (ANDREASEN et al., 1995a; PETROVIC et al., 2010) e maior taxa de insucesso dos reimplantes (PETROVIC et al., 2010). Além disso, dentes reimplantados em pacientes com idade inferior a 11 anos no momento do trauma apresentaram menor sobrevida (BARRETT e KENNY, 1997b) e a taxa de RRES foi significativamente maior em pacientes com idade inferior a 16 anos no momento do trauma, quando comparados com pacientes adultos (ANDERSSON et al., 1989; EBELEZEDER et al., 1998).

Em relação ao manejo do dente avulsionado, o levantamento clínico realizado por Andreasen e Hjørting-Hansen (1966a) representou um marco ao demonstrar que dentes reimplantados dentro de um período de até trinta minutos apresentaram menores índices de reabsorção. Estudos experimentais demonstraram que há um efeito marcante do **período extra-alveolar** a seco na vitalidade e capacidade clonogênica das células do ligamento periodontal devido à alta permeabilidade das células animais à água, fazendo com que estas se comportem como osmômetros (SÖDER et al., 1977; ANDREASEN, 1981a, OIKARINEN e SEPPA, 1987; LEKIK et al., 1996; LEKIK et al., 1998). Paralelamente às evidências experimentais, vários levantamentos clínicos confirmaram a estreita relação entre o período extra-alveolar e a cicatrização dos dentes reimplantados (ANDERSSON e BODIM, 1990; GONDA et al., 1990; SCHATZ et al., 1995; ANDREASEN et al., 1995b; BARRETT e KENNY, 1997b; KINIRONS et al., 1999; BOYD et al., 2000; KINIRONS et al., 2000; DONALDSON et al., 2005; WERDER et al., 2011). O tempo considerado como crítico para a ótima cicatrização do LP variou entre 5 min (ANDREASEN et al., 1995b; KINIRONS et al., 2000), 15 min (ANDERSSON e BODIN, 1990; DONALDSON e KINIRONS, 2001; CHAPPUIS e von ARX, 2005), 20 min (KINIRONS et al., 1999) e 30 min (ANDREASEN e HJØRTING-HANSEN, 1966a; BOYD et al., 2000).

Além da desidratação ocasionada pelo período extra-alveolar a seco, após uma avulsão, as células do LP remanescentes na superfície da raiz são privadas do suprimento sanguíneo e perdem seus metabólitos celulares armazenados. Para manter um metabolismo celular fisiológico, estes nutrientes devem ser repostos o mais rápido possível (ANDREASEN, 1978; ANDREASEN, 1981b;;LINDSKOG E BLOMLOF, 1982; BLOMLÖF et al., 1983). Sendo assim, como a maioria dos reimplantes não acontece dentro do período ideal, vários **meios de armazenamento** tem sido propostos com o objetivo de repor metabólitos celulares e propiciar um pH e pressão osmótica fisiológicos em condições extra-alveolares prolongadas. O quadro 1 apresenta um resumo das várias soluções propostas, suas principais propriedades, e as vantagens e desvantagens de seu emprego (UDOYE et al., 2012). Apesar da variada gama de substâncias propostas na literatura para o armazenamento de dentes avulsionados as evidências disponíveis sobre o desempenho clínico destas soluções são escassas e com exceção do estudo de Andreasen et al. (1995b) apresentam amostras muito pequenas. Além disso os poucos estudos disponíveis, apresentam variações no desfecho estudado bem como na metodologia estatística utilizada, limitando assim a comparação dos resultados e conclusões mais consistentes. De acordo com estes dados, pode-se concluir em síntese que, dentes armazenados em meios de cultura apresentaram os melhores prognósticos (POHL et al., 2005a; POHL et al., 2005b; POHL et al., 2005c; WERDER et al., 2011) seguidos do leite, soro fisiológico ou saliva (MACKIE e WORTHINGTON, 1992; ANDREASEN et al., 1995b; WERDER et al. 2011) e água (ANDREASEN et al., 1995b). Além do período extra-alveolar e do meio de armazenamento, lesões coronárias adicionais à avulsão, contaminação visível da superfície radicular também foram citados como fatores determinantes da ocorrência de RRE após o reimplante dentário (DONALDSON e KINIRONS, 2001).

Quadro 1: Substâncias propostas como meio de armazenamento para dentes avulsionados

Meio de Armazenamento	Composição/ pH/ Osmolaridade	Vantagens	Desvantagens	Tempo Máximo de Armazenamento
Água	Ph 7.4 – 7.79 Osmolaridade 30mOsm Kg ⁻¹	Melhor desempenho do que o armazenamento a seco	Hipotônica	20 min
Saliva	PH - Osmolaridade 60-75mOsm Kg ⁻¹ Capacidade clonogênica 7.6%	Desempenho melhor do que a água e meio seco após armazenamento Fácil acesso	Hipotônica, Presença de enzimas e bactérias	30 min
Soro Fisiológico	PH 6 Osmolaridade 290mOsm Kg ⁻¹	Desempenho melhor do que a água e meio seco após armazenamento por até 30 min Fácil Acesso	Hipotônico Ausência de íons essenciais e glicose	30 min
Solução de lentes de contato	Solução salina	Não há vantagens em seu uso	Provocam danos ao LP	
Leite	pH (6.5-7.2) e Osmolaridade similar ao fluido extra-celular (250-270 mOsm Kg ⁻¹),	Mantém a viabilidade, capacidade clonogênica e mitogênica das células do LP Fácil Acesso e baixo custo	Não repõe metabólitos	3 horas
Clara de ovo	PH 8.6 – 9.38 Osmolaridade 258 mOsm Kg ⁻¹	Sem diferenças significativas quando comparado à HBSS nos tempos 1, 2, 4, 8 e 12 horas, mostra-se mais adequado que leite e água.	Difícil acesso	
Água de coco	Isotônico natural- contém aminoácidos, proteínas, vitaminas e minerais Alta osmolaridade Ph 4.1	Mantém células viáveis após certo tempo.	Baixo Ph	
Gatorade	Solução isotônica carboidratos, sódio e potássio	Desempenho melhor do que o da água	Não possui osmolaridade fisiológica	
Própolis	PH e Osmolaridade variável. Dependente do tipo de própolis e concentração usadas.	Alta capacidade antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, antifúngica. Tem ação na regeneração de tecidos. Inibe a maturação de osteoclastos	Difícil acesso Falta de padronização das soluções disponíveis	

(continua)

(conclusao)

Meio de Armazenamento	Composição/ pH/ Osmolaridade	Vantagens	Desvantagens	Tempo Maximo de armazenamento
Solução salina Balanceada de Hank	Solução salina enriquecida com metabólitos essenciais e glicose Isotônica, pH	Mantém a vitalidade, capacidade clonogênica e mitogênica das células do LP; Reposição de metabolitos	Alto custo Acesso limitado Armazenamento limitado	24 horas
Meio de Eagle	Aminoácidos, vitaminas e bicarbonatos.	Mantém a viabilidade, capacidade clonogênica e mitogênica das células do LP	Armazenamento sob refrigeração Difícil acesso	24 h
Meio de Eagle modificado(Dubelco)	Meio de Eagle enriquecido com vitaminas e glicose	Compatível com a vitalidade celular da maioria das células	Difícil acesso	24 h
Custodiol	Solução de keto-glutarato de histidina-triptofano Baixo conteúdo de potássio Osmolaridade 310mOsm Kg ⁻¹	Composição similar ao fluido extracelular.	Difícil acesso	24 h
Dentosafe-box (meio cultura)	Similar aos meios de transporte de órgãos a serem transplantados contém sais, aminoácidos, glicose e vitaminas	Mantém a vitalidade do LP por até 48 h	Vencimento em 3 anos Não está disponível em todos os países	24 h
Viaspan	Solução para armazenamento de órgãos a serem transplantados Osmolaridade 320mOsm Kg ⁻¹ pH 7.4	Mantém a vitalidade do LP por longos períodos	Difícil acesso Necessidade de refrigeração	72h

Entre os fatores relacionados ao tratamento do dente avulsionado, o **tratamento da superfície radicular** foi sugerido como medida paliativa para minimizar os quadros de RRE em dentes reimplantados após longos períodos extra-alveolar e armazenamento em condições desfavoráveis. Entre as várias substâncias sugeridas somente a solução de fluoreto de sódio se mostrou eficaz uma vez que evidências experimentais demonstraram que a incorporação de íons fluoreto à estrutura da raiz conferiu-lhe na maior resistência à reabsorção (SCHULMAN et al., 1973). Este efeito foi confirmado em um levantamento clínico, uma vez que dentes tratados com fluoreto de sódio apresentaram uma redução de 50% na progressão da RRE (COCCIA, 1980).

O uso de **antibioticoterapia sistêmica** imediatamente após o reimplante tem sido recomendado na maioria dos protocolos para tratamento das lesões traumáticas (ANDERSSON et al., 2012; AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY, 2007; MALASYAN MINISTRY OF HEALTH, 2002; GREG e BOYD, 1998) com o objetivo de se minimizar os efeitos deletérios da infecção bacteriana na cicatrização do LP e viabilizar o processo de revascularização (ANDERSSON et al., 2012; HINCKFUSS e MESSER, 2009c). Embora o emprego sistêmico de antibiótico tenha sido associado experimentalmente a menores índices de reabsorção inflamatória (HAMMARSTRÖM et al., 1986 b; SAE-LIM et al., 1998a; 1998b), este efeito não foi confirmado em levantamentos clínicos (ANDREASEN e HJØRTING-HANSEN, 1966 b; ANDREASEN et al., 1995b; BARRETT; KENNY, 1997b) e os resultados de uma meta-análise revelaram que os benefícios antibioticoterapia sistêmica foram inconclusivos (HINCKFUSS e MESSER, 2009c).

O papel do **tipo e período de imobilização** nos índices de cicatrização do LP após o reimplante dentário não é consenso na literatura uma vez que a associação entre imobilização prolongada e maiores índices de anquilose relatada em um estudo clínico (KINIRONS et al., 1999) e em alguns estudos experimentais (ANDREASEN, 1975; NASJLETI et al., 1982; ANDERSSON et al., 1985) não foi observada no estudo experimental de Berude et al. (1988) e não pode ser comprovada em outros acompanhamentos clínicos (ANDERSSON e BODIN, 1990; ANDREASEN et al., 1995b; SAE-LIM e YUEN, 1997; HINCKFUSS e MESSER, 2009b).

O **momento do tratamento endodôntico** tem grande influência na cicatrização dos dentes reimplantados e depende do grau de rizogênese e duração do período extra-oral. Dados da literatura tem confirmado que a remoção do conteúdo pulpar deve ser realizado entre 7 e 10 dias após o reimplante de dentes com rizogênese completa com o objetivo de se prevenir a RREI (ANDREASEN, 1981e; BLOMLÖF et al., 1992; KINIRONS et al., 1999, HINCKFUSS e MESSER, 2009a). Outro aspecto relativo ao tratamento endodôntico de dentes reimplantados é a

necessidade e duração da **medicação intra-canal**. Estudos experimentais demonstraram uma maior sobrevivência de dentes cujo tratamento endodôntico foi finalizado em curto período de tempo quando comparados com aqueles que necessitaram de um tratamento prolongado com hidróxido de cálcio (HAMMARSTRÖM et al., 1986c; LENGHEDEN et al., 1991; TROPE et al., 1992). Não obstante, a interpretação destes resultados deve levar em consideração o grau de rizogênese e a ocorrência e magnitude de quadros de reabsorção pré-existentes (TROPE et al., 1995).

Diante da vasta gama de estudos clínicos e experimentais apresentados pode-se concluir que a idade no momento do trauma e fatores clínicos relacionados ao manejo e tratamento do dente avulsionado, desempenham um importante papel na ocorrência e evolução das RRE após reimplantes dentários. Entretanto, embora estes fatores participem na etiopatogenia das RRE, não são capazes de explicar completamente as diferenças interindividuais observadas. Paralelamente, constata-se uma escassez de informações sobre o papel da resposta imune do paciente na patogênese das RRE.

Considerando-se a importância das citocinas e outros fatores locais na biologia do tecido ósseo e nas patologias que envolvem aumento da atividade de reabsorção algumas perguntas são pertinentes: (1) Qual é o perfil imunoinflamatório dos diferentes padrões de reabsorção radicular, RRES e RREI, observadas após os reimplantes dentários? (2) A ocorrência de polimorfismos funcionais em genes que codificam para citocinas e outras moléculas envolvidas no processo de reabsorção dos tecidos mineralizados podem atuar determinando diferentes padrões na evolução clínica da RRES e da RREI? (3) Estes parâmetros imunológicos e genéticos podem ser utilizados como preditores da evolução clínica da RRES e da RREI? Nossa **hipótese** é a de que a RREI e RRES apresentam diferentes padrões de expressão de citocinas e de outros fatores locais envolvidos no processo de reabsorção dos tecidos mineralizados e que polimorfismos funcionais nos genes que codificam para estes mediadores podem estar associados a fatores de susceptibilidade determinantes da evolução mais agressiva e severa das RRE pós-traumáticas.

3- OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo estudar a ocorrência de reabsorções radiculares externas após o reimplante de dentes permanentes, sua associação com fatores clínicos e genéticos bem como a expressão de mediadores locais do processo de reabsorção.

3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a ocorrência de RREI e RRES após reimplantes de dentes permanentes.
- b) Avaliar o papel da idade no momento do trauma, período extra-alveolar e meio de armazenamento do dente avulsionado, momento da pulpectomia, período de imobilização e uso de antibioticoterapia sistêmica no momento do reimplante na ocorrência e evolução de RREI e RRES após reimplantes de dentes permanentes;
- c) Avaliar a associação entre polimorfismos nos genes que codificam para as citocinas IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-10, RANK, RANKL, OPG, e para as collagenases MMP2 e MMP9 e a ocorrência e evolução de RREI e RRES após o reimplante de dentes permanentes.
- d) Dosar os níveis das citocinas IL-1 β , IL-1RA, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF α , INF γ , RANK, OPG; das quimiocinas IL-8, CCL2, CCL3, CCL5 e das collagenases MMP2 e MMP9 no tecido perirradicular de dentes extraídos portadores de RREI e RRES.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo consistiu numa avaliação longitudinal retrospectiva dos fatores determinantes da atividade de reabsorção radicular externa após o reimplante de dentes permanentes reimplantados após avulsão traumática em pacientes atendidos no Programa Traumatismos Dentários da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (CTD-FO-UFMG). Os pacientes receberam tratamento emergencial no Pronto Socorro Odontológico do Hospital Municipal Odilon Beherens (PSO-HMOB) e foram encaminhados para continuidade do tratamento na Clínica de Traumatismos Dentários da FO –UFMG (CTD-FO-UFMG), ambos serviços integrantes do Programa Traumatismos Dentários da FO- UFMG. O reimplante de todos os dentes incluídos no estudo foi realizado de acordo com o protocolo adotado no Programa desde 1994, baseado na literatura disponível à época (ANDREASEN e ANDREASEN, 1994). As manobras adotadas consistiram na remoção do coágulo pela irrigação do alvéolo com soro fisiológico, introdução do dente avulsionado dentro do alvéolo até atingir a região apical, com pressão digital lenta e gradual. Após a verificação radiográfica do correto posicionamento o dente foi imobilizado utilizando-se fio de aço inox para amarrilho (0,10" 0,25mm), fixado com resina composta fotopolimerizável. Somente dentes com completo desenvolvimento radicular e ápice fechado (estágio radicular 7) (MOORREES et al., 1963) e com período de acompanhamento de pelo menos 1 ano foram incluídos neste estudo. Os pacientes portadores de avulsão traumática admitidos na CTD-FO-UFMG receberam tratamento endodôntico inicial de acordo com protocolos específicos definidos na CTD-FO-UFMG e retornaram anualmente para monitoramento clínico e radiográfico dos dentes reimplantados. A padronização radiográfica foi baseada em critérios previamente definidos na literatura (ANDREASEN e ANDREASEN, 1985) e consistiu na realização de 3 radiografias periapicais (ortoradial, mesializada e distalizada) pela técnica do paralelismo, utilizando-se filmes periapicais (Kodak ®Ultra-speed DF 58, no. 2, Eastman Kodak Company Rochester, NY, USA) e posicionadores de filmes (Cone®, Maquira Dental Products, Maringá, PR, BR).

4.1 Seleção da amostra

O grupo de estudo avaliado constituiu-se de 165 pacientes, portadores de 205 dentes permanentes reimplantados após avulsão traumática. Dados relativos à idade no momento do trauma, sexo, dente acometido, período extra-alveolar e meio de armazenamento do dente avulsionado, tempo decorrido entre o reimplante e o início do tratamento endodôntico radical, período de imobilização, uso de antibioticoterapia sistêmica e grau de rizogênese no momento do trauma foram coletados nos dos prontuários dos pacientes. Foram excluídos pacientes que apresentavam alterações sistêmicas debilitantes e/ou usuários de fármacos capazes de modificar

a resposta inflamatória padrão do indivíduo. Além disso, pacientes com histórico de lesão traumática anterior e pacientes portadores de outras lesões traumáticas adicionais no dente avulsionado, tais como fratura coronária com exposição pulpar, fratura coronorradicular, fratura radicular ou fratura do processo alveolar, também foram excluídos. Dentes com alterações perirradiculares de origem endodôntica ou periodontal não relacionadas à reabsorção radicular pós-trauma, dentes com restaurações extensas, que apresentassem tratamentos endodônticos anteriores ou com sinais radiográficos de reabsorção radicular prévia ao trauma também foram excluídos do estudo. Os pacientes ou os representantes legais dos menores de idade foram esclarecidos quanto aos objetivos e metodologia do projeto para então optarem pela participação na pesquisa, preenchendo o consentimento livre e esclarecido, de acordo com o estabelecido pela Resolução no. 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos (ANEXOS A, B, C, D). A pesquisa atendeu aos preceitos éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, justiça e equidade e recebeu parecer favorável do COEP - Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Parecer no. ETIC 003.0.203.000-11) (ANEXO E).

4.2 Indicadores radiográficos da atividade de reabsorção radicular externa

Para estudo da atividade de reabsorção uma série de radiografias periapicais de cada dente reimplantado, composta pela radiografia inicial, realizada no momento do reimplante, uma radiografia realizada no momento de início do tratamento endodôntico e uma radiografia de cada controle anual, realizadas durante o período de acompanhamento foram examinadas por dois examinadores, de forma independente, após terem sido devidamente codificadas, para que a identidade do paciente não fosse conhecida. Para cada radiografia foi calculado o índice radiográfico de reabsorção radicular de acordo com os critérios descritos por Andersson et al.(1989), 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 (Fig. 3). As pontuações de cada seção foram adicionadas para se calcular o índice de reabsorção radicular de cada radiografia.

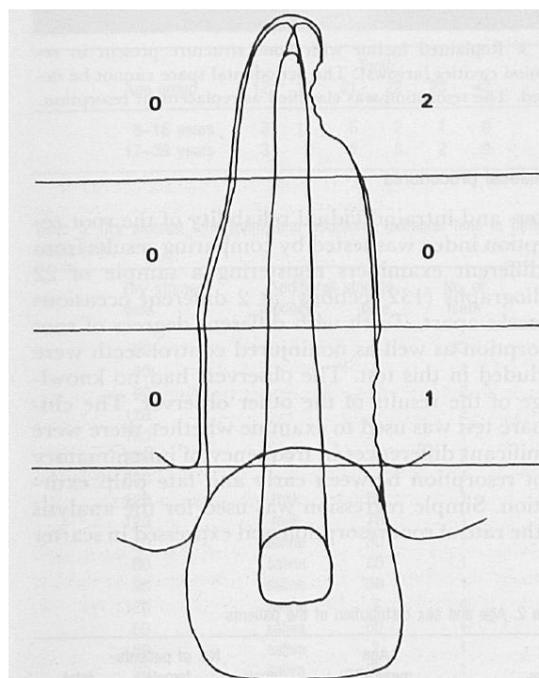


Figura 3: Desenho esquemático do critério para cálculo do índice radiográfico de reabsorção: Critérios para pontuação da profundidade da cavidade de reabsorção a partir da superfície externa da raiz nos terços apical, médio e cervical das faces mesial e distal da raiz, para cálculo do índice radiográfico de reabsorção de Andersson et al. (1989): 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).

Cada terço foi também classificado quanto ao tipo de reabsorção de acordo com critérios descritos na literatura (ANDREASEN et al., 1995b). Áreas radiolúcidas em forma de concha ao longo da superfície da raiz e no osso alveolar adjacente e foram classificados RREI. Áreas de irregularidade da superfície radicular, sem LP e com imbricamento do osso alveolar foram classificadas como RRES. De acordo com o número de seções inflamatórias ou por substituição, em cada radiografia, o dente foi classificado como portador de RREI (Fig.4), RRES (Fig.5) ou reabsorção mista (Fig.6).

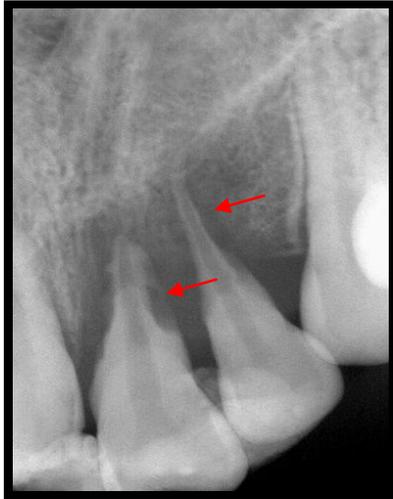


Figura 4: Aspecto radiográfico da RREI: Elementos 21 e 22 com áreas radiolúcidas no 1/3 medio e apical da raiz dos elementos 21 e 22 e no osso alveolar adjacente (setas vermelhas).



Figura 5: Aspecto radiográfico da RRES: Elemento 11 com imbricamento do osso alveolar na estrutura radicular e ausência de ligamento periodontal e lâmina dura (seta preta).

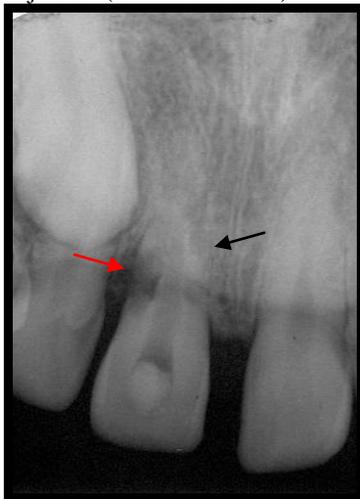


Figura 6: Aspecto radiográfico de reabsorção mista: cavidades na superfície externa da raiz preenchidas por osso, ausência de ligamento periodontal e lâmina dura (seta preta) e cavidades radiolúcidas na superfície da raiz e osso alveolar adjacente, perda de identidade do ligamento periodontal e lâmina dura (seta vermelha).

4.3 Análise de polimorfismos

4.3.1 Obtenção das amostras e extração de DNA

Após a seleção clínica e radiográfica dos casos que atendiam aos critérios de inclusão no estudo, os pacientes foram convocados para obtenção das amostras de DNA por meio de raspagem bilateral da mucosa oral com o auxílio de uma espátula de plástico. Este raspado foi transferido para solução tampão (KCl 4mM, NaCl 124mM, C₆H₁₂O₆ 10mM, C₈H₁₇N₂NaO₄S 23mM, MgSO₄ 1mM) e armazenado a -20°C. O DNA das amostras coletadas foi extraído utilizando-se o método descrito por Boom et al. (1990) modificado. Este método baseia-se na adesão do DNA à sílica, permitindo sua purificação por precipitação, conforme descrito a seguir: cada raspado armazenado em solução tampão foi submetido à centrifugação a 11.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma pipeta e descartado em solução de hipoclorito 1%. Ao *pellet* foram adicionados 450µL de solução de lise (GuSCN 4M, Tris-HCl 50mM, EDTA 22mM, Triton X-100 1,2%) e 20µL de solução de sílica (SiO₂ lavado com H₂O). Cada *pellet* foi ressuspenso utilizando-se o vórtex e incubado a 56°C por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante foi descartado em solução de hipoclorito 1%. O *pellet* foi ressuspenso em 450µL de solução de lavagem – L2 (GuHCl 6M, Tris-HCl 60mM) e as amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante descartado. Uma nova lavagem com L2 foi realizada. Ao *pellet* foi adicionado 450µL de etanol 70%. O *pellet* foi ressuspenso com o auxílio de vórtex e as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 1 minuto, sendo o sobrenadante descartado. Uma nova lavagem com etanol 70% foi realizada. Em seguida, foi adicionado ao *pellet*, 450µL de acetona 100%. As amostras foram novamente centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e, os *ependorfs* contendo os *pellets* das amostras foram colocados em termobloco (*BioPlus*) à 56°C por 30 minutos, com as tampas abertas para a completa eliminação da acetona. Os *pellets* foram ressuspenso em 100µL de tampão TE (Tris-HCl 10mM e EDTA 1mM – pH=8) com o auxílio de vórtex e incubados em termobloco à 56°C por 12h. Após este período, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 10.000 rpm por 2 minutos. O DNA desprendido da sílica e solubilizado no tampão TE, foi transferido para um novo *ependorf* previamente identificado e

armazenado a -20°C . A quantificação da concentração de DNA de cada amostra foi realizada em *NanoDrop 1000 (Thermo Scientific)* utilizando-se $1\mu\text{L}$ da amostra de DNA.

4.3.2 Identificação dos genótipos

Para a determinação do genótipo dos SNPs estudados, as amostras de DNA foram submetidas à amplificação pelo método da reação em cadeia da polimerase em tempo real RT-PCR, utilizando-se sondas e iniciadores do sistema TaqMan® confeccionados pela *Applied Biosystems* para cada SNP. O sistema TaqMan utiliza, além dos iniciadores, uma sonda (oligonucleotídeo) que libera um sinal fluorescente quando a polimerase começa a sintetizar o fragmento de DNA. A relação dos polimorfismos estudados é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1: Relação dos polimorfismos estudados

Polimorfismo	Troca de Bases	Cromossomo	Identificação
IL-1 α	C/T	2q14	rs 1800587
IL-1 β	C/T	2q14	rs 1143634
IL-1ra	C/T	2q13	rs 419598
IL-10	A/G	1q31	rs 1800896
RANK	C/G	18q22	rs 8086340
OPG	C/G	8q24	rs 2073618
RANKL	A/G	13q14	rs 2277438
MMP2a	C/T	16q13	rs 2285053
MMP2b	C/T	16q13	rs 243865
MMP2c	A/G	16q13	rs 243866
MMP9	C/T	20q11	rs 3918242

Para a reação de PCR, além dos pares de iniciadores e sondas específicos para cada SNP (TaqMan® SNP *Genotyping assay*), foi utilizado um mix contendo desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP's), a enzima Taq polimerase e tampão de incubação (*Genotyping Master Mix*), e DNA genômico. Diferentes concentrações de DNA foram testadas, obtendo-se o melhor resultado com a alíquota de 50ng. A quantidade dos demais reagentes de acordo com as informações do fabricante e são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Reagentes utilizados na RT PCR

Reagentes	Quantidade
Genotyping Master Mix	10 μ L
Genotyping assay (20X)	1 μ L
DNA genômico	50ng
H2O de injeção	q.s.p 20 μ L

A reação de PCR foi realizada utilizando o termociclador CFX96TM *Real-Time PCR Detection System* (BioRad) e consistiu em uma desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Essas reações foram realizadas em placas de 96 poços, sendo incluídos um controle negativo e um positivo. A determinação dos genótipos para cada polimorfismo estudado foi realizada utilizando-se o *software CFX-Manager* da Bio-Rad. Considerando que cada alelo está associado a um fluoróforo diferente, a apresentação de apenas um sinal fluorescente refere-se ao genótipo homocigoto, enquanto a apresentação de dois sinais fluorescentes refere-se ao genótipo heterocigoto (Fig.7)

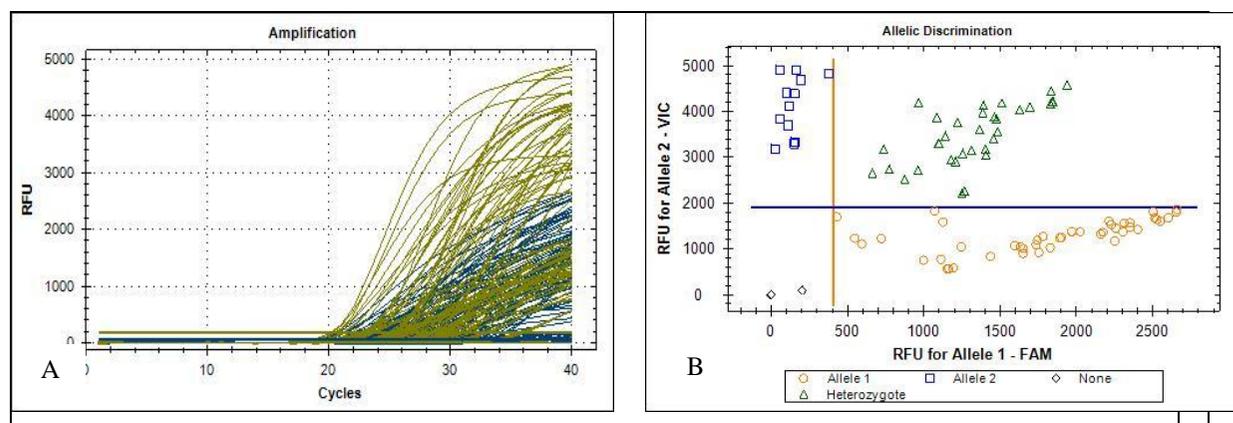


Figura 7: Gráficos representativos da PCR em tempo real para a análise do SNP rs1800587 IL1A. (A) – curvas de amplificação: azul (FAM) – alelo C; verde (VIC) – alelo T. (B) – discriminação alélica: homocigoto FAM (círculos alaranjados – CC), homocigoto VIC (quadrado azul – TT), heterocigoto (triângulos verdes – CT), controle positivo (círculo roxo) e controle negativo (losango preto). Fonte: Bastos et al, 2014.

4.4 Quantificação de citocinas, quimiocinas e MMPs no tecido perirradicular de dentes portadores de RRE

Para avaliação da expressão de citocinas e quimiocinas nos tecidos perirradiculares de dentes reimplantados portadores de RRE, foram utilizados 63 dentes reimplantados com indicação de exodontia, provenientes de 56 pacientes em tratamento na CTD-FO-UFMG.

Cada dente foi classificado quanto ao índice e tipo de reabsorção radicular externa de acordo com a radiografia realizada na data da extração. Segundo o critério radiográfico o grupo de estudo foi constituído de 22 dentes portadores de RREI, 24 dentes portadores de RRES e 17 dentes portadores de reabsorções mistas. As amostras do grupo controle foram obtidas de 5 voluntários com dentes saudáveis, que se encontravam em tratamento na Clínica de Ortodontia da FO-UFMG, portadores de um total de 16 pré-molares hígidos, com rizogênese completa, sem alterações periapicais ou periodontais e com indicação ortodôntica para exodontia. Os dentes do grupo controle foram submetidos à pulpectomia previamente à extração. Os fragmentos radiculares e o material curetado do alvéolo foram pesados, armazenados em solução tampão na proporção de 10 µl/1µg (*PBS - 0.4 mM NaCl and 10 mM NaPO₄, + inibidores de protease - 0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA, 0.01 mg/ml aprotinin A, + 0.05% Tween-20*) e estocados a - 70°C. Para realização do ensaio as amostras foram maceradas em homogeneizador (Fisher Scientific* PowerGen* Model 1000) e centrifugados a 1000 rpm a 4°C. As concentrações de IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFNγ, TNFα, TGFβ, IL-8/CXCL8, CCL2, CCL3, CCL5, RANK, OPG MMP2 e MMP9 foram determinadas pelo método ELISA. A relação das citocinas, quimiocinas e MMPs dosadas bem como dos *kits* comerciais utilizados é apresentada na tabela 3.

Tabela 3: Relação das citocinas, quimiocinas e MMPs quantificadas e kits comerciais utilizados

Citocina	Técnica	Fabricante	Identificação	Número catálogo
IL-1 β	ELISA	R&D Systems, Inc.	DuoSet $\text{\textcircled{R}}$ IL-1	DY201
IL-1RA	ELISA	R&D Systems, Inc.	DuoSet $\text{\textcircled{R}}$ IL-1ra	DY280
IL-4	ELISA	R&D Systems, Inc.	DuoSet $\text{\textcircled{R}}$ IL-4	DY204
IL-6	ELISA	R&D Systems, Inc.	DuoSet $\text{\textcircled{R}}$ IL-6	DY206
IL-10	ELISA	R&D Systems, Inc.	DuoSet $\text{\textcircled{R}}$ IL-10	DY217B
IL-17a	ELISA	R&D Systems, Inc.	DuoSet $\text{\textcircled{R}}$ IL-17a	DY317
IFN γ	ELISA	R&D Systems, Inc.	DuoSet $\text{\textcircled{R}}$ IFN γ	DY285
TNF α	ELISA	R&D Systems, Inc.	DuoSet $\text{\textcircled{R}}$ TNF- α	DY210
TGF β	ELISA	R&D Systems, Inc.	DuoSet $\text{\textcircled{R}}$ TGF- β	DY240
OPG	ELISA	R&D Systems, Inc.	DuoSet $\text{\textcircled{R}}$ OPG	DY805
RANK	ELISA	R&D Systems, Inc.	DuoSet $\text{\textcircled{R}}$ RANK	DY683
MMP2	ELISA	R&D Systems, Inc.	DuoSet $\text{\textcircled{R}}$ MMP-2/TIMP-2 Complex	DY1497
MMP9	ELISA	R&D Systems, Inc.	DuoSet $\text{\textcircled{R}}$ MMP-9/TIMP-2 Complex	DY1453
IL-8	ELISA	R&D Systems, Inc.	DuoSet $\text{\textcircled{R}}$ IL-8	DY 208
CCL2	ELISA	R&D Systems, Inc.	DuoSet $\text{\textcircled{R}}$ CCL2/MCP-1	DY279
CCL3	ELISA	R&D Systems, Inc.	DuoSet $\text{\textcircled{R}}$ CCL3/MIP-1	DY270
CCL5	ELISA	R&D Systems, Inc.	DuoSet $\text{\textcircled{R}}$ CCL5/RANTES	DY278

Para o Ensaio imunoenzimático, placas de 96 poços com alta afinidade para proteínas (Corning) foram cobertas *overnight* a 4°C com o anticorpo monoclonal para cada citocina. Após o bloqueio, as amostras e as respectivas citocinas recombinantes utilizadas como padrões foram incubadas durante duas horas em temperatura ambiente com anticorpos biotinizados de coelho. Em seguida, 50 μ l de avidina-HRP (1:5000) foi adicionada a cada poço, após 30 minutos as placas foram lavadas e o reagente de cor ofenilediamino dihidrocloro (OPD) (Sigma) (40 μ g/poço) foi adicionado. Após 15 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 75 μ L de ácido sulfúrico (1 M) e a absorbância foi medida a 490 nm (Spectra Max 250). A concentração de cada citocina foi calculada com base em uma curva padrão (4 a 4000 pg/mL). Os resultados foram expressos em picogramas de citocinas (+SD) por miligrama de tecido perirradicular.

4.5 Análise estatística

Para estudo do efeito das variáveis demográficas, clínicas e genéticas estudadas no índice de reabsorção inicial e no tipo de reabsorção inicial final utilizou-se um modelo de regressão logística binária onde cada variável foi testada individualmente quanto à sua associação com cada um dos indicadores da atividade de reabsorção tendo como variável resposta o tipo de reabsorção (inicial e final): RREI ou RRES, ou o índice inicial de reabsorção radicular, agrupado em reabsorções leves (índice inicial ≤ 4) ou reabsorções moderadas e graves (índice inicial >4). As variáveis que apresentaram $p < 0,25$ na análise univariada foram testadas num modelo de regressão logística multivariada (MICKEY e GREENLAND, 1989). A medida de associação entre as variáveis explicativas e a variável resposta estudada foi calculada utilizando-se a razão das chances (RC) com intervalo de confiança a 95% (IC 95%) e nível de significância a 5%.

Para o estudo da progressão das reabsorções radiculares no longo prazo foi realizada uma análise de sobrevivência utilizando-se o modelo de taxa de falhas proporcionais de Cox tendo como variável resposta o tempo decorrido a partir do reimplante, até se atingir índices de reabsorção superiores a 6 (falha). A matriz de variância-covariância robusta foi utilizada para corrigir os erros padrões dos estimadores do modelo devido a analisarmos mais de um dente reimplantado por paciente. Além disso, o modelo de Cox foi ajustado para incorporar o efeito das covariáveis que também eram dependentes do tempo, ou seja, que modificaram sua condição ao longo do acompanhamento, a saber: realização do TER e presença de imobilização. A adequação do modelo foi verificada para possíveis interações entre covariáveis e para garantir a suposição de taxas de falhas proporcionais.

Para estudo dos níveis de citocinas, quimiocinas e MMPs nos diferentes tipos de reabsorção, utilizou-se, o modelo de regressão linear comparando-se as médias logarítmicas da concentração de cada uma das citocinas, quimiocinas e MMPs estudadas nos diferentes grupos amostrais e no grupo controle sem reabsorção. O nível de significância foi corrigido segundo Bonferroni.

Os testes de associação entre os SNPs estudados e os indicadores da atividade de reabsorção foram realizados para cada genótipo separadamente e para os genótipos agrupados de acordo com a presença/ausência do alelo polimórfico de acordo com critérios sugeridos na literatura (SASIENE, 1997; ZOU e DONNER, 2006).

Considerando-se a possibilidade de correlação nos casos em que mais de um dente foi reimplantado no mesmo paciente todas as análises foram realizadas utilizando-se o

modelo de equações de estimação generalizadas -GEE (*Generalized Estimated Equation*), com matriz de simetria composta que é a abordagem padrão para medidas repetidas (DIGGLE et al., 2003).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se os programas estatísticos *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS Versão 17.0), e o software R (versão 3.0.3, Viena, Áustria). A distribuição de frequência dos genótipos de cada um dos polimorfismos estudados foi testada quanto ao equilíbrio de Hard-Weinberg utilizando-se o teste qui-quadrado. O *software Haploview* foi utilizado para as análises de formação de haplótipos (BARRETT, 2005).

5- RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Distribuição de frequência das variáveis explicativas e dos indicadores da atividade de reabsorção

Para o estudo da ocorrência, tipo e evolução das reabsorções radiculares externas a amostra selecionada constituiu-se de 165 pacientes sendo 123 do sexo masculino (74,5%) e 42 do sexo feminino (25,5%) com um total de 205 dentes reimplantados após avulsão traumática. A distribuição segundo o dente envolvido está ilustrada no gráfico 1. Os dentes mais afetados foram os incisivos centrais superiores.

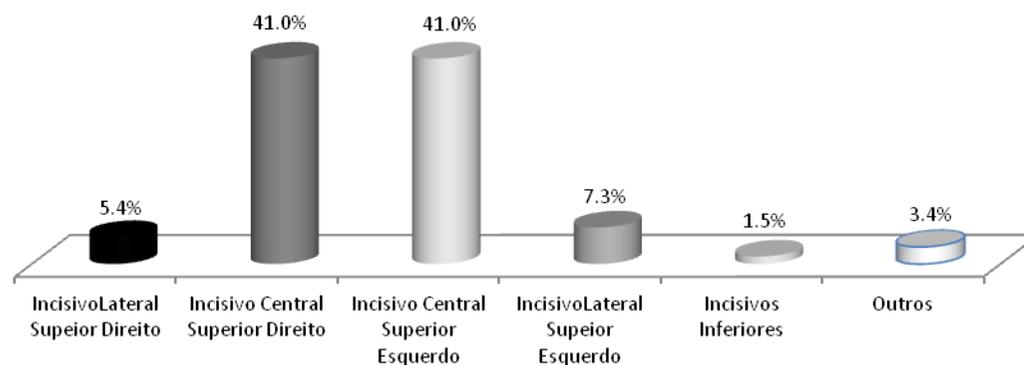


Gráfico 1: Distribuição de frequência da amostra de acordo com o dente acometido

A idade dos pacientes no momento do trauma variou de 7,6 a 33,1 anos (média de 12,7 anos \pm 3,8). Os pacientes foram acompanhados por um período mínimo de 1 ano e máximo de 16 anos (mediana = 37 meses).

5.1.1 Distribuição de frequência das variáveis relacionadas ao manejo dos dentes avulsionados

O período extra-alveolar mediano dos dentes reimplantados foi de 120 min (variação de 5 min a 3 dias) sendo que somente 7,8% dos reimplantes foram realizados até 15 minutos após a ocorrência do trauma. A distribuição dos dentes de acordo com as condições de armazenamento do dente durante o período extraoral demonstra que na maioria dos casos, os dentes foram mantidos secos (40,5%) seguido da utilização do leite

(21,0%) e soro fisiológico (18,0%). Também foram utilizados como meio de armazenamento a água (13,2%) e a saliva (7,3%). A Tabela 4 apresenta a distribuição dos dentes de acordo com meio de armazenamento e período extra-alveolar.

Tabela 4: Distribuição de frequência dos dentes segundo o meio de armazenamento e período extra-alveolar

Meio de Armazenamento	Período Extra-alveolar		Total n(%)
	≤ 15 min n(%)	>15min n(%)	
A seco	1 (1,2)	82 (98,8)	83 (40,5)
Leite	1 (2,3)	42 (97,7)	43 (21,0)
Soro Fisiológico	3 (8,1)	34 (91,9)	37 (18,0)
Água	4 (14,8)	23 (85,2)	27 (13,2)
Saliva	7 (46,7)	8 (53,3)	15 (7,3)
Total	16 (7,8)	189 (92,2)	205 (100,0)

Os dados relativos ao tempo decorrido entre o momento do trauma e o início do TER demonstram que este período variou de 1 dia a 39,6 meses sendo que o período mediano para início do tratamento endodôntico foi de 2,2 meses após o trauma. Em 7,3% da amostra a pulpectomia foi realizada até 15 dias após o trauma. Todos os dentes reimplantados receberam imobilização flexível utilizando-se fio para osteossíntese 0.10” fixado com resina composta fotopolimerizável. O período de imobilização variou de 7 dias a 2,9 anos sendo que o período mediano foi de 49 dias. Antibioticoterapia sistêmica foi prescrita em 32,1% dos casos.

5.1.2 Distribuição de frequência dos indicadores da atividade de reabsorção

O gráfico 2 apresenta a distribuição de frequência dos dentes de acordo com o tipo de RRE observada na consulta de início do TER e na consulta final do acompanhamento do paciente. Observa-se que antes da pulpectomia o tipo de reabsorção predominante foi a RREI e, no longo prazo, predominou a RRES.

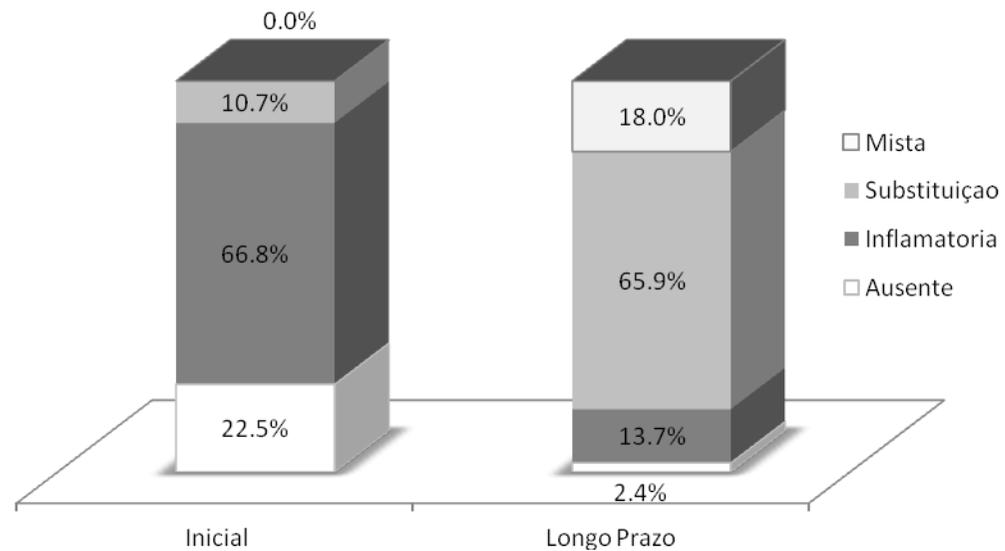


Gráfico 2: Distribuição da amostra segundo o tipo de reabsorção radicular externa observada na consulta inicial e ao final do acompanhamento

O índice de RRE observado na consulta de início do TER foi considerado como índice inicial de reabsorção. Para cada radiografia realizada nos controles anuais foi medido o índice de reabsorção e o dente reimplantado foi classificado de acordo com o índice máximo de RRE observado ao longo do período de preservação. A distribuição da amostra de acordo com os índices inicial e final de RRE é apresentada no gráfico 3.

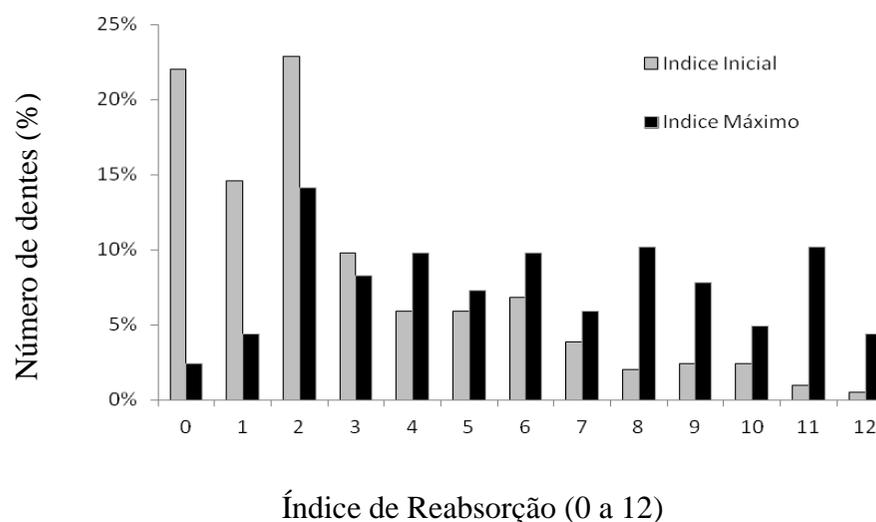


Gráfico 3: Distribuição de frequência dos dentes segundo o índice inicial e máximo de RRE

Para os estudos de associação a amostra foi classificada de acordo com o índice inicial em dois grupos: reabsorções leves (índices ≤ 4), que representou 75,1% dos casos (154 dentes); e reabsorção inicial moderada ou grave (índices > 4), correspondendo a 24,9% dos casos (51 dentes). O ponto de corte utilizado para a classificação dos dentes de acordo com índice máximo foi o índice 6 que corresponde à perda de 50% da estrutura da raiz. De acordo com este critério 56,1% da amostra (105 dentes) apresentou índice máximo ≤ 6 e 43,9% (90 dentes) apresentou índice máximo > 6 . O tempo mediano decorrido entre o trauma e o momento em que o índice de reabsorção superou o índice 6 foi de 10,7 meses variando entre 2,1 meses e 9 anos.

5.1.3 Distribuição de frequência das variáveis genéticas

A distribuição de frequência dos genótipos e alelos dos polimorfismos estudados nos genes *IL1A*, *IL1B*, *IL1RN* e *IL10* é apresentada na tabela 5 .

Tabela 5: Distribuição de frequências dos genótipos e alelos dos SNPs estudados nos genes *IL1A*, *IL1B*, *IL1RN* e *IL10*

Polimorfismos		n (%)	HW
<i>IL1A</i> (-889 C/T) rs 1800587			
Genótipos	CC	74 (44,9)	P= 0.99
	CT	73 (44,2)	
	TT	18 (10,9)	
Alelos	C	221 (67%)	
	T	109 (33%)	
<i>IL1B</i> (+3954C/T) rs 1143645			
Genótipos	CC	113 (69,3)	P=0.84
	CT	45 (27,6)	
	TT	5 (3,1)	
Alelos	C	271 (83,1%)	
	T	55 (16,9%)	
<i>IL1RN</i> (+2018 C/T) rs 419598			
Genótipos	TT	104 (63,0)	P=0.28
	TC	51 (30,9)	
	CC	10 (6,1)	
Alelos	T	259 (78,5%)	
	C	71 (21,5%)	
<i>IL10</i> (-1082A/G) rs 1800896			
Genótipos	AA	94 (57,0)	P=0.008
	AG	52 (31,5)	
	GG	19 (11,5)	
Alelos	A	240 (72,7)	
	G	90 (27,3)	

A distribuição de frequência dos genótipos e alelos dos polimorfismos estudados nos genes *TNFRSF11A* (RANK), *TNFRSF11B* (OPG) e *TNFSF11* (RANKL) é apresentada na tabela 6.

Tabela 6 : Distribuição de frequências dos genótipos e alelos dos SNPs estudados nos genes *TNFRSF11A* (RANK), *TNFRSF11B* (OPG) e *TNFSF11* (RANKL)

<i>TNFRSF11A</i> (RANK) (+35579C/G) rs 8086340			HW
Genótipos	GG	54 (32,7)	P=0.01
	GC	68 (41,2)	
	CC	43 (26,1)	
Alelos	G	176(53,4)	
	C	154(46,6)	
<i>TNFRSF11B</i> (OPG) (+1181 C/G) rs 2073618			
Genótipos	GG	18 (10,9)	P=0.99
	GC	73 (44,2)	
	CC	74 (44,8)	
Alelos	G	109 (33,0)	
	C	221 (77,0)	
<i>TNFSF11</i> RANKL (A/G) rs 2277438			
Genótipos	AA	102(61,8)	P=0.005
	AG	47 (28,5)	
	GG	16 (9,7)	
Alelos	A	251 (76,1)	
	G	79 (23,9)	

A distribuição de frequência dos genótipos e alelos dos polimorfismos estudados nos genes *MMP9* e *MMP2* é apresentada na tabela 7.

Tabela 7: Distribuição de frequências dos genótipos e alelos dos SNP estudados nos *MMP2* e *MMP9*

<i>MMP2</i> (-735C/T) rs 2285053			HW
Genótipos	CC	105 (76,1)	P=0.39
	CT	32 (23,8)	
	TT	1 (0,7)	
Alelos	C	242 (87,7)	
	T	34 (12,3)	
<i>MMP2</i> (-1306C/T) rs 243865			
Genótipos	CC	112 (74,7)	P=0.0002
	CT	28 (18,7)	
	TT	10 (6,7)	
Alelos	C	252 (84,0)	
	T	48 (16,0)	
<i>MMP2</i> (-1557 A/G) rs 243866			
Genótipos	AA	3 (2,8)	P=0.75
	AG	27 (25,5)	
	GG	76 (71,7)	
Alelos	A	30 (14,4)	
	G	179 (85,6)	
<i>MMP9</i> (-1562C/T) rs 3918242			
Genótipos	CC	-	P<0.0001
	CT	139 (97,9)	
	TT	3 (2,1)	
Alelos	C	139 (48,9)	
	T	145 (51,1)	

Considerando-se que os polimorfismos da família IL-1 e da MMP2 estão localizados no mesmo cromossomo (chr. 2 e chr. 16 respectivamente), foi realizada a avaliação da formação de haplótipos e análise de desequilíbrio de ligação. Os resultados dessa análise demonstraram que os polimorfismos da família IL-1 (rs1800587 p=0,68, rs1143634 p= 0,70, rs 419598 p=0,27) e aqueles no gene que codifica para MMP2 (rs 2285053 p=0,08, rs 243865 p=0,44, rs243866 p=0,53) não formaram haplótipos e, portanto, não estão em desequilíbrio de ligação na amostra estudada.

5.2 Estudo do efeito da idade, fatores relacionados ao manejo e tratamento do dente avulsionado e fatores genéticos na atividade de reabsorção inicial

A primeira etapa deste trabalho consistiu no estudo da associação entre idade e fatores relacionados ao manejo do dente avulsionado (meio de armazenamento e período extra-alveolar), tratamento inicial da avulsão (tempo de imobilização, momento do TER e uso de antibioticoterapia sistêmica) e fatores genéticos (polimorfismos nos genes *IL1B*, *IL1A*, *IL1RN*, *IL10*, *RANK*, *RANKL*, *OPG*, *MMP2* E *MMP9*) e os indicadores da atividade inicial de reabsorção observados na consulta de início do tratamento endodôntico radical. Para esta etapa foi utilizado o modelo de regressão logística binária onde cada variável explicativa foi testada individualmente quanto à sua associação com cada um dos indicadores estudados tidos como variável resposta: tipo de reabsorção inicial classificada como RREI ou RRES, ou índice inicial de reabsorção radicular classificada como leve (≤ 4) e moderado ou grave (> 4).

5.2.1 Estudo da associação entre a idade, fatores relacionados ao manejo do dente avulsionado e tratamento inicial e a atividade de reabsorção inicial

Para o estudo do efeito da idade do paciente no momento do trauma as análises foram realizadas considerando-se os pontos de corte apontados na literatura como determinantes da atividade de reabsorção radicular pós-trauma, a saber: 11 anos (BARRETT e KENNY, 1997b) e 16 anos (ANDERSSON et al., 1989). Para o estudo de associação da covariável meio de armazenamento, os dentes mantidos em água, soro ou saliva durante o período extra-alveolar foram agrupados na categoria meios úmidos uma vez que apresentaram desempenho semelhante no estudo clínico realizado por Andreasen et al. (1995b). As variáveis contínuas, período extra-alveolar (tempo de permanência do dente em ambiente extra-alveolar), tempo de imobilização e momento do TER (tempo decorrido entre o reimplante e o início do tratamento endodôntico radical), sofreram transformação logarítmica por apresentarem grande assimetria.

Os resultados desta análise foram publicados no artigo “*Age and timing of pulp extirpation as major factors associated with initial inflammatory root resorption in replanted permanent teeth*” (BASTOS et al., 2014) (ANEXO F). De acordo com a Tabela 2 do referido artigo (BASTOS et al., 2014) pode-se observar que a idade no momento do trauma apresentou-se significativamente associada com a ocorrência de RRE inicial uma vez que pacientes com mais de 16 anos de idade no momento do trauma apresentaram 87%

menos chance de desenvolver REE, quando comparados os casos de RREI+RRES com aqueles com RRE ausente (RC 0,23, IC95% 0,08 – 0,61 p=0,003). Essa associação também foi significativa quando comparados somente os casos de RREI com os casos de RRE ausente (RC 0,23 IC95% 0,08-0,65, p=0,02) e para os casos de RRES (RC 0,13 IC95% 0,02-0,99 p=0,049). O momento do TER também foi determinante da ocorrência de RRE inicial uma vez que cada dia decorrido entre o reimplante e o início do TER aumentou a probabilidade de desenvolver REE (RREI+RRES) em 1.3% quando considerada a amostra como um todo (RC 1,013 IC95% 1,004 – 1,021 p=0,003), em 1.2% quando considerados os casos de RREI (RC 1,012 IC 95% 1,003 – 1,020 p=0,005) e 1.1% quando considerados os casos de RRES (RC 1,011 IC95% 1,003 – 1,018, p= 0,006). Além disso observa-se na Tabela 3 do artigo em tela (BASTOS et al., 2014) uma associação entre o ponto de corte de 11 anos e a extensão da RREI uma vez que pacientes com mais de 11 anos no momento do trauma apresentaram menor chance de apresentar reabsorções moderadas e graves (RC 0,36 IC95% 0,15-0,85, p=0,02). Esta análise não foi possível para o grupo com RRES tendo em vista o pequeno número de casos.

Não foram observadas diferenças significativas entre a idade no momento do trauma, período extra-alveolar, meio de armazenamento, uso de antibioticoterapia sistêmica, momento do TER e tempo de imobilização, quando comparados os dentes portadores de RREI com aqueles portadores de RRES na consulta inicial (Tabela 8).

Tabela 8: Análise univariada da associação entre idade, fatores relacionados ao manejo e tratamento do dente avulsionado e o tipo de reabsorção inicial

Fatores determinantes	Tipo de reabsorção inicial		RC (IC 95%)p
	RREI	RRES	
Idade no momento do trauma	n(%)	n(%)	
≤ 11 anos	50 (80,6)	12 (19,4)	Referência
> 11 anos	87 (89,7)	10 (10,3)	2,09 (0,81 – 5,4) p=0,13
≤ 16 anos	123 (87,2)	18 (12,8)	Referência
> 16 anos	14 (77,8)	4 (22,2)	1,92 (0,46 – 8,01) p= 0,37
Período Extra-alveolar (min)			
Mediana (Variação)	130 (5 – 2880)	120 (5 – 1440)	0,97 (0,88 – 1,06)p= 0,49*
Meio de armazenamento			
Seco	54 (83,1)	11 (16,9)	Referência
Leite	32 (97,0)	1 (3,0)	0,14 (0,02 – 1,07)p= 0,06
Soro, saliva, Água	51 (83,6)	10 (16,4)	1,01 (0,38 – 2,7)p= 0,98
Antibioticoterapia sistêmica**			
Sim	17 (94,4)	1 (5,6)	Referência
Não	32 (82,1)	7 (17,9)	3,71 (0,41 – 33,29) p=0,24**
Momento da Pulpectomia (dias)			
Mediana (Variação)	75 (14 – 1206)	111,5 (16 – 629)	1,01 (0,99 – 1,02) p=0,29*
Periodo de Imobilização (dias)			
Mediana (Variação)	52 (7 -1061)	64 (7 – 465)	1,00 (0,98-1.02) p=0,83*

* RC calculada após transformação logarítmica

** RC calculada para n=57

5.2.2 Estudo da associação entre os SNPs estudados e o tipo de reabsorção observada na consulta de início do TER

Para o estudo do efeito das variáveis genéticas na atividade de reabsorção inicial, a distribuição genotípica de cada SNP foi testada em relação ao tipo de reabsorção inicial, RREI x RRES. Para efeito desta análise os 3 genótipos foram testados individualmente ou agrupados de acordo com a presença/ausência do alelo polimórfico. Os SNPs que apresentaram valores de $p < 0,25$ na análise univariada, foram testados em um modelo de regressão logística multivariada juntamente com as covariáveis clínicas. A tabela 9 apresenta os resultados da análise univariada da distribuição dos genótipos dos SNPs

estudados nos genes *IL1A*, *IL1B*, *IL1RN* e *IL-10* quando comparados os grupos portadores de RREI e RRES inicial, utilizando o modelo de regressão logística.

Tabela 9: Análise univariada da distribuição genotípica dos SNPs estudados nos genes *IL1A*, *IL1B*, *IL1RN* e *IL-10* de acordo com o tipo de RRE inicial

Polimorfismos	Tipo de RRE inicial		RC (IC95%) p	
	RREI	RRES		
<i>IL1A</i>				
(-889 C/T) rs 1800587				
Genótipos	CC	67 (85,9)	11 (14,1)	Referência
	CT	55 (85,9)	10 (14,1)	1,02 (0,38 – 2,73) p=0,97
	TT	15 (88,2)	2 (11,8)	0,82 (0,16 – 4,24) p=0,82
Presença Alelo T	T- (CC)	67 (85,9)	11 (14,1)	Referência
	T+ (CT+TT)	70 (86,4)	11 (13,6)	0,96 (0,38 – 2,49) p=0,96
<i>IL1B</i>				
(3974 C/T) rs 1143645				
Genótipos	CC	98 (88,3)	13 (11,7)	Referência
	CT	33 (82,5)	7 (17,5)	1,69 (0,6 – 4,76) p=0,32
	TT	5 (83,3)	1 (16,7)	1,31 (0,18 – 9,33) p=0,79
Presença Alelo T	T- (CC)	98 (88,3)	13 (11,7)	Referência
	T+ (CT+TT)	38 (82,6)	8 (17,4)	1,64 (0,61 – 4,4) p=0,33
<i>IL1RN</i>				
(2018 C/T) rs 419598				
Genótipos	TT	78 (81,3)	17 (17,9)	Referência
	TC	48 (90,6)	5 (9,4)	0,51 (0,17 – 1,53) 0,23
	CC	11 (100,0)	0	NA
Presença Alelo C	C- (TT)	78 (81,3)	18 (18,8)	Referência
	C+ (CC+CT)	60 (92,3)	5 (7,7)	0,42 (0,14 – 1,23) p=0,11
<i>IL10</i>				
(-1082A/G) rs 1800896				
Genótipos	AA	84 (88,4)	11 (11,6)	Referência
	AG	38 (80,9)	9 (19,1)	1,82 (0,66 – 5,01) p=0,25
	GG	15 (88,2)	2 (11,8)	1,07 (0,21 – 5,53) p=0,93
Presença Alelo G	G- (AA)	84 (88,4)	11 (11,6)	Referência
	G+ (AG+GG)	53 (81,5)	11 (17,2)	1,61 (0,63 – 4,14) p=0,32

A tabela 10 apresenta os resultados da análise univariada da distribuição dos genótipos dos SNPs estudados nos genes *TNFRSF11A* (RANK), *TNFRSF11B* (OPG) e *TNFSF11* (RANKL), *MMP2* quando comparados os grupos portadores de RREI e RRES inicial, utilizando o modelo de regressão logística. Observa-se que pacientes portadores da variante alélica C (CC+CG) do SNP rs 2073618 do gene *TNFSRF11B* que codifica para OPG predominaram no grupo com RREI inicial (p=0,03) quando comparado com o grupo com RRES.

Tabela 10: Análise univariada das frequências genóticas dos SNPs estudados nos genes *TNFRSF11A* (RANK), *TNFRSF11B* (OPG), *TNFSF11* (RANKL) e *MMP2* de acordo com o tipo de RRE inicial

Polimorfismos	Tipo de RRE inicial		RC (IC95%) p	
	RREI	RRES		
<i>TNFRSF11A</i>(RANK) (+35579C/G) rs 8086340				
		n(%)	n(%)	
Genótipos	GG	46 (88,5)	6 (11,5)	Referência
	GC	57 (89,1)	7 (10,9)	0,87 (0,27 – 2,82) p=0,82
	CC	34 (79,1)	9 (20,9)	1,85 (0,57 – 6,02) p=0,31
Presença Alelo C	C- (GG)	103 (88,0)	14 (12,0)	Referência
	C+ (CC+GC)	34 (79,1)	9 (20,9)	1,21 (0,43 – 3,41) p=0,72
<i>TNFRSF11B</i>(OPG) (+1181 G/C) rs 2073618				
		n(%)	n(%)	
Genótipos	GG	12 (66,7)	6 (33,3)	Referência
	GC	63 (90,0)	7 (10,0)	0,23 (0,06 – 0,88) p=0,03
	CC	62 (87,3)	9 (12,7)	0,31(0,08 – 1,11) p=0,07
Presença Alelo C	C- (GG)	12 (66,7)	6 (33,3)	Referência
	C+ (CG+CC)	126 (81,0)	17 (11,9)	0,27 (0,08 – 0,89) p=0,03
<i>TNFSF11</i> (RANKL) (C/G) rs 2277438				
		n(%)	n(%)	
Genótipos	AA	79 (84,0)	14 (16,0)	Referência
	AG	42 (87,5)	6 (12,5)	0,77 (0,27 – 2,15) p=0,62
	GG	16 (88,9)	2 (11,1)	0,63 (0,07 – 5,34) p=0,67
Presença Alelo G	G- (AA)	79 (84,0)	14 (16,0)	Referência
	G+ (AG+GG)	58 (87,9)	8 (11,9)	0,74 (0,27 – 1,98) p=0,55
<i>MMP2</i> (-735C/T) rs 2285053				
		n(%)	n(%)	
Genótipos	CC	87 (87,9)	12 (12,1)	Referência
	CT	23 (74,2)	8 (25,8)	2,47 (0,84 – 7,21) p=0,1
	TT	1 (100,0)	0	NA
Presença Alelo T	T- (CC)	87 (87,9)	12 (12,1)	Referência
	T+ (CT+TT)	24 (75,0)	8 (25,0)	2,36 (0,81 – 6,86) p=0,12
<i>MMP2</i> (-1306C/T) rs 243865				
		n(%)	n(%)	
Genótipos	CC	92 (84,3)	17 (15,6)	Referência
	CT	21 (87,5)	3 (12,5)	0,86 (0,22 – 3,35) p=0,83
	TT	9 (90,0)	1 (10,0)	0,61 (0,07 – 5,25) p=0,65
Presença AleloC	T- (CC)	92 (84,4)	17 (15,6)	Referência
	C+ (CC+CT)	30 (88,2)	4 (11,8)	0,78 (0,24 – 2,58) p=0,68
<i>MMP2</i> (-1557 A/G) rs 243866				
		n(%)	n(%)	
Genótipos	AA	3 (100,0)	0	Referência
	AG	20 (87,0)	3 (13,0)	NA
	GG	62 (83,8)	12 (16,2)	
Presença AleloA	A+(AA+AG)	23 (88,4)	3 (11,6)	0,77 (0,19 – 3,1) p=0,71
	A+ (GG)	62 (83,8)	12 (16,2)	Referência

A presença da variante alélica C (GC+CC) no SNP rs2073618 do gene *TNFSRF11B* (p=0,03), a presença da variante alélica C (CC+CT) no SNP rs 419598 do gene *IL1RN* (p=0,11) e a presença da variante alélica T (CT+TT) no SNP rs 2285053 no gene *MMP2* (p=0,12) foram testados em um modelo de regressão multivariada, juntamente com a idade no momento do trauma considerando-se o ponto de corte de 16 anos (p=0,13), meio de armazenamento (p=0,06) e uso de antibioticoterapia sistêmica (p=0,24) uma vez que apresentaram valores de p<0,25. Após análise conjunta dos fatores citados somente a presença da variante alélica C do SNP rs 2073618 do gene que codifica para OPG, apresentou uma associação significativa com a ocorrência de RREI inicial sendo que pacientes portadores dos genótipos CC+CG apresentaram chance 3,5 vezes maior de desenvolver RREI inicial em relação à RRES (RC 0,28 IC95% 0,09 – 0,93 p=0,038).

5.2.3 Estudo da associação entre os SNPs estudados e o índice de reabsorção observado na consulta de início do TER

Para o estudo do efeito dos polimorfismos no índice de reabsorção observado na consulta inicial, os 3 genótipos de cada SNP foram testados em relação aos grupos com reabsorções iniciais leves (≤ 4) e com reabsorções iniciais moderadas ou graves (> 4). Em seguida os genótipos foram agrupados de acordo com a presença/ausência do alelo alto produtor. Os genótipos que apresentaram valores de p<0,25 na análise univariada foram testados em um modelo de regressão multivariada juntamente com a idade e fatores clínicos que apresentaram valores de p<0,25. Os resultados obtidos demonstraram que não foram observadas diferenças significativas nas frequências genotípicas dos SNPs estudados nos genes da família IL-1, nos genes que codificam para as citocinas do eixo RANK-RANKL-OPG e no gene *MMP2* quando comparados os grupos com reabsorção leves (índices ≤ 4) de e aqueles com reabsorções moderadas e graves (índices > 4). Entretanto, os resultados atuais sugerem que o genótipo do paciente em relação ao gene *IL10* pode estar envolvido na susceptibilidade à RREI uma vez que pacientes portadores do alelo G+ (AG + GG) no SNP rs 1800896 apresentaram 65% menos risco de desenvolver RREI severa, quando comparado com os genótipos G- (AA) (RC 0,35 IC 95% 0,13-0,94 p =0,038). Estes resultados foram sintetizados no manuscrito:

- a) ***A study of the interleukin-1 gene cluster polymorphisms and inflammatory external root resorption in replanted permanent teeth***
(Submetido para publicação no periódico International Journal of Endodontics – ANEXO G);

- b) *IL10 gene polymorphism is associated with inflammatory root resorption in replanted permanent teeth* (Manuscrito em preparação ANEXO H);
- c) *Polymorphisms in RANK-RANKL-OPG axis and inflammatory external root resorption in replanted teeth* (Manuscrito em preparação –ANEXO I).

5.3 Estudo da associação entre a idade, fatores genéticos, manejo e tratamento do dente avulsionado, e a atividade de reabsorção no longo prazo

Na segunda etapa deste trabalho foi feito um estudo do efeito da idade, manejo do dente avulsionado (meio de armazenamento e período extra-alveolar), tratamento inicial da avulsão (tempo de imobilização, momento do TER e uso de antibioticoterapia sistêmica) e fatores genéticos (polimorfismos nos genes *IL1B*, *IL1A*, *IL1RN*, *IL10*, *RANK*, *RANKL*, *OPG*, *MMP2* e *MMP9*), na atividade de reabsorção no longo prazo, avaliando-se os dois indicadores: o tipo de reabsorção observado radiograficamente na consulta final do acompanhamento do paciente e a evolução da atividade de reabsorção considerando-se o tempo decorrido desde o momento do reimplante até a superação do índice 6 de reabsorção.

5.3.1 Estudo da associação entre a idade no momento do trauma, fatores clínicos e genéticos e o tipo de reabsorção observado no longo prazo

Para avaliação dos determinantes do tipo de reabsorção observado no longo prazo utilizou-se o modelo de regressão logística onde cada variável explicativa foi avaliada individualmente quanto à sua associação com a ocorrência de RREI e RRES final. Para efeito desta análise foram excluídos 5 casos que não apresentaram reabsorção e os 37 casos que apresentaram diagnóstico de reabsorções mistas no ultimo controle. Sendo assim as análises foram realizadas para a subamostra de 163 casos portadores de RRES (n=135) e RREI (n=28). As variáveis explicativas idade e período extra-alveolar foram dicotomizadas de acordo com critérios previamente descritos na literatura (ANDERSSON et al., 1989; BARRETT e KENNY, 1997b). A variável meio de armazenamento também foi reagrupada em 3 categorias de acordo com a literatura (ANDREASEN et al., 1995b).

Não foram observadas diferenças significativas entre a idade no momento do trauma, meio de armazenamento, período extra-alveolar, tempo de imobilização, momento

do TER e uso de antibioticoterapia sistêmica quando comparados os dentes portadores de RREI com aqueles portadores de RRES na consulta final (Tabela 11).

Tabela 11: Análise univariada da associação entre idade, fatores relacionados ao manejo e tratamento do dente avulsionado e o tipo de RRE final

Fatores determinantes	Tipo de RRE final		RC (IC 95%)p
	RREI	RRES	
Idade no momento do trauma	n(%)	n(%)	
≤ 11 anos	12 (19,7)	49 (80,3)	Referência
> 11 anos	16 (15,7)	86 (84,3)	0,28 (0,56 – 3,2) p=0,53
≤ 16 anos	24(17,3)	115 (82,7)	Referência
> 16 anos	4 (16,7)	20 (83,3)	0,89 (0,27 – 2,95) p= 0,85
Periodo Extra-alveolar (min)			
Mediana (Variação)	125 (17 – 300)	120 (5 – 4320)	1,04 (0,99 – 1,11)p= 0,14*
Meio de armazenamento			
Seco	11(17,5)	52 (82,5)	Referência
Leite	5 (14,3)	30 (85,7)	1,11 (0,34 – 3,63)p= 0,87
Soro, saliva, Agua	12 (18,5)	53 (81,5)	0,92 (0,36 – 2,34)p= 0,86
Antibioticoterapia sistêmica			
Sim	2 (9,5)	19 (90,5)	Referência
Não	5 (10,6)	42 (89,4)	0,38 (0,04 – 3,54) p=0,39**
Momento da Pulpectomia (dias)			
Mediana (Variação)	68 (6 – 776)	65 (1 – 1096)	1,0 (0,99-1,01) p=0,91*
Periodo de Imobilização (dias)			
Mediana (Variação)	56 (14 -477)	41 (7 – 1061)	0,99 (0,97-1,0) p=0,17*

*RC calculada após transformação logarítmica

** RC calculada para 61 casos.

Para o estudo do efeito das variáveis genéticas, os 3 genótipos de cada SNP foram testados individualmente ou agrupados de acordo com a presença/ausência do alelo polimórfico. A tabela 12 apresenta os resultados da análise univariada do efeito dos genótipos quando comparados os grupos portadores de RREI e RRES final, utilizando o modelo de regressão logística.

Tabela 12: Análise univariada da associação dos SNPs estudados nos genes *IL1A*, *IL1B*, *IL1RN* e *IL-10* de acordo com o tipo de RREfinal

Polimorfismos	Tipo de RRE final		RC (IC95%) p	
	RREI	RRES		
<i>IL1A</i>				
(-889 C/T) rs 1800587				
Genótipos	CC	12 (16,9)	59 (83,1)	Referência
	CT	14 (18,7)	61 (81,3)	0,92 (0,38 – 2,25) p=0,86
	TT	2 (11,8)	15 (88,2)	1,58 (0,33 – 7,64) p=0,57
Presença Alelo T	T- (CC)	12 (16,9)	59 (83,1)	Referência
	T+ (CT+TT)	16 (17,4)	76 (82,6)	1,0 (0,43 – 2,36) p=0,99
<i>IL1B*</i>				
(+3974 C/T) rs 1143645				
Genótipos	CC	21 (19,8)	85 (80,2)	Referência
	CT	7 (15,2)	39 (84,8)	1,29 (0,49 – 3,35) p=0,6
	TT	0 (83,3)	9 (100,0)	NA
Presença Alelo T	T- (CC)	21 (82,6)	85 (80,2)	Referência
	T+ (CT+TT)	7 (88,3)	48 (87,3)	1,55 (0,6 – 3,99) p=0,37
<i>IL1RN</i>				
(+2018 C/T) rs 419598				
Genótipos	TT	18 (17,8)	83 (82,2)	Referência
	TC	8 (15,1)	45 (84,9)	1,46 (0,56 – 3,81) p=0,44
	CC	2 (22,2)	7 (77,8)	0,7 (0,12 – 3,95) p=0,68
Presença Alelo C	C- (TT)	18 (17,8)	83 (82,2)	Referência
	C+ (CC+CT)	10 (16,1)	52 (83,9)	1,27 (0,52 – 3,09) p=0,59
<i>IL10</i>				
(-1082A/G) rs 1800896				
Genótipos	AA	16 (18,2)	72 (81,8)	Referência
	AG	11 (20,0)	44 (80,0)	0,96 (0,38 – 2,4) p=0,93
	GG	1 (5,0)	19 (95,0)	4,16 (0,51 – 33,8) p=0,18
Presença Alelo G	G- (AA)	16 (18,2)	72 (81,8)	Referência
	G+ (AG+GG)	12 (16,0)	63 (84,0)	1,28 (0,53 – 3,07) p=0,58

*n= 161

A tabela 13 apresenta os resultados da análise univariada do efeito dos genótipos quando comparados os grupos portadores de RREI e RRES final, utilizando o modelo de regressão logística.

Tabela 13: Análise univariada da associação dos SNPs estudados nos genes *TNFRSF11A* (RANK), *TNFRSF11B* (OPG) e *TNFSF11* (RANKL) e *MMP2* de acordo com o tipo de RRE final

Polimorfismos	Tipo de RRE final		RC (IC95%) p	
	RREI	RRES		
<i>TNFRSF11A</i>(RANK) (+35579C/G) rs 8086340				
		n(%)	n(%)	
Genótipos	GG	11 (20,0)	44 (80,0)	Referência
	GC	9 (13,4)	58 (86,6)	1,72 (0,63 – 4,7) p=0,29
	CC	8 (19,5)	33 (80,5)	1,1 (0,38 – 3,21) p=0,85
Presença Alelo C	C- (GG)	11 (20,0)	44 (80,0)	Referência
	C+ (CC+GC)	17 (15,7)	91 (84,3)	1,43 (0,6 – 3,39) p=0,42
<i>TNFRSF11B</i>(OPG) (+1181 C/G) rs 2073618				
Genótipos	GG	1 (5,3)	18 (94,7)	Referência
	GC	19 (27,5)	50 (72,5)	0,17 (0,02 – 1,35) p=0,09
	CC	8 (10,7)	67 (89,3)	0,5 (0,06 – 4,42) p=0,53
Presença Alelo C	C- (GG)	1 (5,3)	18 (94,7)	Referência
	C+ (CC+CG)	27 (18,8)	117 (81,3)	0,26 (0,03 – 2,09) p=0,21
<i>TNFSF11</i> (RANKL) (C/G) rs 2277438				
Genótipos	AA	16 (80,0)	80 (83,3)	Referência
	AG	10 (20,4)	39 (79,6)	0,73 (0,29 – 1,87) p=0,51
	GG	2 (11,1)	16 (88,9)	1,63 (0,35 – 7,63) p=0,54
Presença Alelo G	G- (AA)	16 (80,0)	80 (83,3)	Referência
	G+ (AG+GG)	12 (17,9)	55 (82,1)	0,87 (0,36 – 2,07) p=0,75
<i>MMP2</i> (-735C/T) rs 2285053				
Genótipos	CC	18 (17,5)	85 (82,5)	Referência
	CT	3 (9,7)	28 (90,3)	2,85 (0,59 – 13,8) p=0,19
	TT	0	1 (100,0)	NA
Presença Alelo T	T- (CC)	18 (17,5)	85 (82,5)	Referência
	T+ (CT+TT)	3 (9,4)	29 (90,6)	2,99 (0,62 – 14,5) p=0,17
<i>MMP2</i> (-1306C/T) rs 243865				
Genótipos	CC	17 (15,7)	91 (84,3)	Referência
	CT	3 (10,3)	26 (89,7)	1,49 (0,39 – 5,66) p=0,56
	TT	1 (11,1)	8 (88,9)	1,46 (0,17 – 12,8) p=0,73
Presença Alelo C	T- (CC)	92 (84,4)	91 (84,3)	Referência
	C+ (CC+CT)	30 (88,2)	8 (88,9)	1,48 (0,45 – 4,85) p=0,52
<i>MMP2</i> (-1557 A/G) rs 243866				
Genótipos	AA	1 (33,3)	2 (66,7)	Referência
	AG	2 (7,1)	26 (92,9)	5,78 (0,35 – 95,8) p=0,22
	GG	14 (17,9)	64 (82,1)	2,22 (0,19 – 26,4) p=0,53
Presença Alelo G	G- (AA)	1 (33,3)	2 (66,7)	Referência
	G+ (AG+GG)	16 (15,1)	90 (84,9)	2,07 (0,23 – 31,49) p=0,43

Os genótipos dos SNP rs 2073618 no gene *TNFSRF11B* que codifica para OPG, do SNP rs 1800896 no gene *IL10* e dos SNPs rs 243865 e rs 243866 no gene *MMP2* foram testados em um modelo de regressão logística multivariada, juntamente com as variáveis clínicas que apresentaram valores de $p < 0,25$, tempo de imobilização e período extra-alveolar. Nenhuma das variáveis testadas pode ser associada à ocorrência de RREI ou RRES ao final do acompanhamento uma vez que não alcançaram significância no modelo final.

5.3.2 Estudo da associação entre a idade no momento do trauma, fatores clínicos e genéticos com o índice de reabsorção observado no longo prazo

Para estudo da atividade de reabsorção observada no longo prazo foi realizada uma análise de sobrevivência, pelo modelo de Cox, considerando-se como variável desfecho o tempo decorrido entre o reimplante e a superação do índice de reabsorção 6. Inicialmente foi feita uma análise univariada para testar a associação de cada variável com a progressão da atividade de reabsorção ao longo do período de acompanhamento. Esta análise foi realizada para a amostra como um todo e separadamente para os casos que apresentaram RRES na consulta final. A análise separada para os grupos com RREI e com reabsorções Mistas ficou inviabilizada pelo pequeno número de casos em cada um destes grupos. A tabela 14 apresenta os resultados da análise univariada e multivariada da associação entre idade, fatores relacionados ao manejo e tratamento do dente avulsionado e a progressão da reabsorção final, realizadas para a amostra como um todo e para os casos portadores de RRES. As variáveis que apresentaram $p < 0,25$ na análise univariada foram testadas conjuntamente na análise multivariada. Observa-se que, quando considerada a amostra total (RREI+RRES+Mista), a idade do paciente no momento do trauma e o armazenamento do dente avulsionado no leite foram determinantes da taxa de progressão da reabsorção. A taxa de progressão rápida da RRE em pacientes com idades inferiores a 16 anos no momento do trauma foi 3,2 vezes aquela dos pacientes com mais de 16 anos. Este efeito da idade fica mais evidente na RRES uma vez que a taxa de progressão rápida em pacientes com menos de 16 anos foi 4,8 vezes aquela observada nos pacientes com mais de 16 anos. Dentes armazenados no leite apresentaram taxa de progressão rápida da RRE 67% menor quando comparados com dentes armazenados a seco. O efeito do meio de armazenamento também fica mais evidente quando considerados os casos de RRES separadamente. Observa-se que dentes armazenados no leite apresentaram taxas de reabsorções agressivas 71% menor do que aqueles mantidos a seco. Para dentes mantidos

no soro, saliva ou água esta taxa de evolução rápida da RRES foi 55% menor. O período de imobilização foi determinante da taxa de evolução da RRES uma vez que cada dia de imobilização correspondeu a um incremento de 0,1% na taxa de evolução rápida da RRES.

TABELA 14- Análise da associação entre idade, fatores relacionados ao manejo e tratamento do dente avulsionado e a progressão da REE final

Fatores	RREI+RRES+Mista (n=205)		RRES (n=135)	
	RTF (IC 95%)p		RTF (IC 95%)p	
Idade no momento do trauma	Univariada	Multivarida	Univariada	Multivarida
≤ 16 anos	Referência	Referência	Referência	Referência
> 16 anos	0,40 (0,18 – 0,89) p= 0,02	0,31 (0,13–0,71)p=0,006	0,22 (0,05 – 1,04) p= 0,06	0,21 (0,04–0,99)p=0,049
Período extra-alveolar				
≤ 15 min	Referência	Referência	Referência	-
> 15 min	2,9 (0,98 – 8,57) p=0,05	2,8 (0,89– 9,05) p=0,08	1,9 (0,55 – 6,93) p=0,31	-
Meio de armazenamento				
Seco	Referência	Referência	Referência	Referência
Leite	0,40 (0,2 – 0,81) p= 0,01	0,33 (0,16 – 0,68)p=0,003	0,30 (0,1 – 0,9) p= 0,04	0,29 (0,1 – 0,86)p=0,03
Soro+Saliva+Água	0,59 (0,36 – 0,95) p=0,03	0,67 (0,35 – 1,29) p=0,23	0,55 (0,28 – 1,09) p=0,09	0,45 (0,23 – 0,87) p=0,02
Antibioticoterapia sistêmica				
Sim	Referência	-	Referência	-
Não	1,24 (0,51 – 3,0) p=0,63	-	1,27 (0,45 – 6,6) p=0,65	-
Momento da Pulpectomia				
Cada dia adicional	1,0(1,0-1,001) p=0,53	-	1,0(1,0-1,002) p=0,13	1,0 (1,0 – 1,003) p=0,87
Tempo de Imobilização				
Cada dia adicional	1,001(1,0 – 1,002) p=0,04	1,001(1,0-1,003)p=0,15	1,001(1,0 – 1,003) p=0,03	1,001(1,0-1,003)p=0,02

A tabela 15 apresenta os resultados dos estudos de associação entre os genótipos dos polimorfismos estudados nos genes da família IL-1 e no gene *IL10* e a progressão da reabsorção radicular ao longo do segmento. Para efeito desta análise inicialmente foram considerados individualmente os 3 genótipos para cada SNP estudado. Além disso os genótipos foram agrupados de acordo com a presença do alelo polimórfico. Observa-se que, mesmo após a correção pela análise conjunta com idade e outros fatores clínicos, pacientes homozigotos para o alelo polimórfico T (TT) no SNP rs 1800587 no gene *IL1A*, apresentaram progressão mais rápida da RRE seja quando considerada a amostra como um todo (RTF 2,09 IC95% 1,12 – 3,9 p=0,02) seja quando analisados os casos de RRES final separadamente (RTF 2,62 IC 95% 1,19 – 5,75 p=0,02). Além disso, observa-se ainda que pacientes homozigotos para o alelo polimórfico C (CC) no SNP rs 419598 no gene que codifica para a IL-1RA, empregaram um tempo maior para atingir índices de reabsorção superiores a 6, ou seja apresentaram progressão mais lenta da RRE ao longo do segmento quando considerado o conjunto dos casos (RTF 0,34 IC 95% 0,16 – 0,7 p=0,003). Para os casos de RRES o modelo multivariado não pode ser ajustado uma vez que não se observaram dentes com índices de RRES final >6 entre os pacientes portadores do genótipo CC.

Tabela 15 –Análise da associação entre os genótipos dos SNPs estudados nos genes *IL1A*, *IL1B*, *IL1RN*, *IL10* e a progressão de RRE final

Polimorfismos		RREI+RRES+Mista (n=205)		RRES n= (135)	
		RTF (IC95%) p		RTF (IC95%) p	
<i>IL1A</i> (-889 C/T) rs 1800587		Univariada	Multivariada*	Univariada	Multivariada*
Genótipos	CC	Referência	Referência	Referência	Referência
	CT	0,94 (0,58 – 1,53) p=0,80	0,89 (0,54 – 1,5) p=0,67	1,18 (0,57 – 2,45) p=0,66	0,89 (0,40 – 1,96) p=0,77
	TT	1,63 (0,74 – 3,59) p=0,22	2,09 (1,12 – 3,9) p=0,02	2,18 (0,79 – 5,97) p=0,13	2,62 (1,19 – 5,75) p=0,02
Presença Alelo T	T- (CC)	Referência	Referência	Referência	Referência
	T+ (CT+TT)	1,06 (0,67 – 1,68) p=0,81	1,08 (0,67 – 1,73) p=0,76	1,36 (0,68 – 2,73) p=0,38	1,16 (0,57 – 2,35) p=0,68
<i>IL1B</i> (+3974 C/T) rs 1143645					
Genótipos	CC	Referência	Referência	Referência	Referência
	CT	1,16 (0,7 – 1,93) p=0,56	1,12 (0,64 – 1,94) p=0,71	1,35 (0,41 – 0,66) p=0,82	1,17 (0,50 – 2,74) p=0,72
	TT	0,76 (0,22 – 2,54) p=0,65	0,7 (0,30 – 1,61) p=0,4	1,29 (0,69 – 0,38) p=0,40	1,09 (0,39 – 2,99) p=0,87
Presença Alelo T	T- (CC)	Referência	Referência	Referência	Referência
	T+ (CT+TT)	1,09 (0,66 – 1,78) p=0,75	1,02 (0,61 – 1,69) p=0,93	1,34 (0,4 – 0,68) p=0,84	1,15 (0,54 – 2,45) p=0,72
<i>IL1RN</i> (+2018 C/T) rs 419598					
Genótipos	TT	Referência	Referência		
	TC	0,97 (0,58 – 1,63) p=0,91	1,06 (0,63 – 1,81) p=0,82		
	CC	0,76 (0,32 – 1,79) p=0,52	0,34 (0,16 – 0,7) p=0,003		
Presença Alelo C	C- (TT)	Referência	Referência	Referência	Referência
	C+ (CC+CT)	0,93 (0,58 – 1,50) p=0,76	0,88 (0,54 – 1,45) p=0,62	0,97 (0,49 – 1,93) p=0,93	1,14 (0,57 – 2,3) p=0,71
<i>IL10</i> (-1082A/G) rs 1800896					
Genótipos	AA	Referência	Referência	Referência	Referência
	AG	1,21 (0,72 – 2,05) p=0,46	0,91 (0,55 – 1,65) p=0,86	1,14 (0,54 – 2,41) p=0,73	0,96 (0,44 – 2,06) p=0,91
	GG	0,89 (0,43 – 1,85) p=0,75	0,92 (0,45 – 1,88) p=0,82	0,9 (0,35 – 2,35) p=0,84	1,22 (0,53 – 2,82) p=0,64
Presença Alelo G	G- (AA)	Referência	Referência	Referência	Referência
	G+ (AG+GG)	1,11 (0,7 – 1,77) p=0,66	0,94 (0,57 – 1,56) p=0,82	1,1 (0,54 – 2,05) p=0,32	1,02 (0,53 – 1,99) p=0,94

*Valores ajustados após análise conjunta com idade (ponto de corte de 16 anos), período extra-alveolar, meio de armazenamento e tempo de imobilização.

O modelo final da análise multivariada do efeito dos SNPs nos genes da família IL-1 na taxa de progressão da RRE é apresentado na tabela 16. Para a amostra total foram testados, no modelo multivariado de Cox, a idade (ponto de corte de 16 anos), meio de armazenamento, período extra-alveolar, período de imobilização e os SNPs rs 1800587 e rs 419598. Observa-se que dentes de pacientes com idade superior a 16 anos no momento do reimplante apresentaram progressão da RRE mais lenta quando comparados com dentes reimplantados em pacientes com menos de 16 anos de idade (RTF 0,29 IC 95% 0,13 – 0,67 p= 0,004). Dentes armazenados no leite (RTF 0,30 IC 95% 0,15 – 0,64 p= 0,002), ou em meios úmidos (RTF 0,5 IC 95% 0,3 – 0,83 p= 0,007) também apresentaram quadros de reabsorção menos agressivas ao longo do segmento quando comparados com dentes mantidos a seco. Dentes que apresentaram período extraoral maior do que 15min apresentaram a taxa de reabsorção rápida 3 vezes maior do que dentes com período extra-alveolar inferior a 15 min (RTF 2,97 IC95% 1,0 – 8,8 p=0,049). Cada dia adicional de imobilização correspondeu a um aumento de 0,2% na taxa de evolução rápida da RRE (RTF 1,002 IC 95% 1,00 – 1,003 p= 0,04). Por fim, quando considerados os três tipos de reabsorção em conjunto, pacientes homozigotos para o alelo polimórfico (CC) no SNP rs 419598 apresentaram progressão mais lenta da RRE (RTF 0,33 IC 95% 0,15 – 0,73 p= 0,006). Após a análise conjunta com os outros fatores, a homozigose para o alelo polimórfico T (TT) perdeu sua associação com a maior taxa de progressão rápida da RRE, ficando entretanto no limiar de significância (RTF 1,87 IC 95% 0,99 – 3,51 p=0,052). Para os casos de RRES o modelo final incluiu idade (ponto de corte 16 anos), meio de armazenamento, período de imobilização e o SNP rs 1800587. De forma semelhante ao observado para a amostra total, pacientes maiores de 16 anos no momento do trauma apresentaram menor probabilidade de progressão rápida da RRES (RTF 0,20 IC 95% 0,04 – 0,97 p= 0,05). Dentes armazenados no leite (RTF 0,26 IC 95% 0,08 – 0,81 p= 0,02) ou em meios úmidos (RTF 0,44 IC 95% 0,23 – 0,85 p= 0,02) também apresentaram menor probabilidade de progressão rápida da RRES. Cada dia de imobilização representou um incremento de 0,2% na probabilidade de progressão rápida da RRES (RTF 1,002 IC 95% 1,0 – 1,003 p=0,02). Além disso, pacientes homozigotos para o alelo polimórfico T no SNP rs 1800587 no gene *IL1A* apresentaram uma probabilidade aproximadamente 2,5 vezes maior de desenvolver RRES de progressão rápida quando comparados com pacientes homozigotos para o alelo ancestral (RTF 2,62 IC 95% 1,19 – 5,75 p= 0,02).

Tabela 16 - Análise multivariada da associação entre idade, fatores relacionados ao manejo e tratamento do dente avulsionado, polimorfismos nos genes *IL1A* e *IL1RN* e a progressão da RRE final

Polimorfismos		RREI+RRES+Mista (n=205)	RRES n= (135)
		RTF (IC95%) p	RTF (IC95%) p
Idade no momento do Trauma			
	≤ 16 anos	Referência	Referência
	> 16 anos	0,29 (0,13 – 0,67) p=0,004	0,20 (0,04 – 0,97) p=0,05
Meio de armazenamento			
	Seco	Referência	Referência
	Leite	0,30 (0,15 – 0,64) p=0,002	0,26 (0,08 – 0,81) p=0,02
	Água+ Soro+Saliva	0,50 (0,3 – 0,83) p=0,007	0,44 (0,23 – 0,85) p=0,02
Período Extra-alveolar			
	≤ 15 min	Referência	-
	> 15 min	2,97 (1,0– 8,83) p=0,049	
Período de Imobilização			
	Cada dia adicional	1,002(1,00-1,003) p=0,04	1,002 (1,0-1,003) p=0,02
<i>IL1A</i> (-889 C/T) rs 1800587			
	CC	Referência	Referência
Genótipos	CT	0,75 (0,44 – 1,29) p=0,31	0,89 (0,40 – 1,96) p=0,77
	TT	1,87 (0,99 – 3,51) p=0,052	2,62 (1,19 – 5,75) p=0,02
<i>IL1RN</i> (+2018 C/T) rs 419598			
	TT	Referência	
Genótipos	TC	1,18 (0,7 – 1,99) p=0,54	
	CC	0,33 (0,15 – 0,73) p=0,006*	

Na tabela 17 são apresentados os resultados do modelo de Cox para avaliação entre os polimorfismos nos genes que codificam para as citocinas do eixo RANK-RANKL-OPG e a progressão da atividade de reabsorção ao longo do segmento. Para esta análise os genótipos foram avaliados individualmente, agrupados de acordo com o alelo ancestral e também de acordo com a presença do alelo polimórfico. Observa-se que para a amostra como um todo, os portadores do alelo G (GG+GC) do SNP 8086340 no gene que codifica para a RANK, apresentaram taxa de evolução rápida da RRE 41% menor quando comparados com a ausência do alelo G (CC) (RTF 0,59 IC 95% 0,35-0,98 p=0,04). Quando considerados os casos de RRES separadamente observa-se que a heterozigose neste apresentou-se associada a uma maior taxa de progressão rápida da RRES (RTF 2.87 IC 95% 1.13 – 7.28 p=0.03). Além disso, a presença do alelo A (AA+AG) no SNP rs 2277438 no gene que codifica para a RANKL também apresentou associação significativa com a evolução mais agressiva da RRE quando comparada com a ausência do alelo A (genótipo GG) (RTF 2,15 IC 95% 0,9 – 5,12 p=0,03). Estas associações entretanto, não permaneceram significativas após a análise conjunta envolvendo os dois SNPs simultaneamente corrigidos por idade, e pelos outros fatores clínicos

Tabela 17 –Análise da associação entre os genótipos dos SNPs estudados nos genes *TNFSRF11A*(RANK), *TNFSRF11B*(OPG), *TNFSF11* (RANKL) e a progressão da RRE final

Polimorfismos		RREI+RRES+Mista n= (205)		RRES n= (135)	
		RTF (IC95%) p		RTF (IC95%) p	
<i>TNFSRF11A</i>(RANK) (+35579C/G) rs 8086340					
Genótipos	GG	Referência	Referência	Referência	Referência
	GC	1,52 (0,87 – 2,66) p=0,14	1,51 (0,84 – 2,72) p=0,17	2,8 (1,19 – 6,57) p=0,02	2,87 (1,13 – 7,28) p=0,03
	CC	0,82 (0,45 – 1,51) p=0,53	0,75 (0,39 – 1,43) p=0,38	1,05 (0,38 – 2,86) p=0,93	1,20 (0,42 – 3,47) p=0,73
Presença Alelo C	G+ (GG+GC)	0,64 (0,39 – 1,07) p=0,09	0,59 (0,35 – 0,98) p=0,04	0,53 (0,24 – 1,15) p=0,11	0,59 (0,28 – 1,28) p=0,18
	G- (CC)	Referência	Referência	Referência	Referência
Presença Alelo C	C- (GG)	Referência	Referência	Referência	Referência
	C+ (CC+GC)	1,23 (0,74 – 2,05) p=0,43	1,16 (0,67 – 2,03) p=0,59	2,08 (0,91 – 4,73) p=0,08	2,16 (0,88 – 5,31) p=0,09
<i>TNFSRF11B</i>(OPG) (+1181 C/G) rs 2073618					
Genótipos	GG	Referência	Referência	Referência	Referência
	GC	2,98 (0,8 – 11,17) p=0,11	2,72 (0,91 – 8,11) p=0,4	3,42 (0,42 – 28,0) p=0,25	2,05 (0,23 – 17,88) p=0,52
	CC	2,04 (0,55 – 7,62) p=0,29	1,81 (0,46 – 7,24) p=0,63	2,48 (0,31 – 20,1) p=0,39	2,04 (0,24 – 17,52) p=0,52
Presença Alelo G	G+ (GG+GC)	1,26 (0,80 – 1,98) p=0,32	1,21 (0,76 – 1,93) p=0,42	1,12 (0,58 – 2,14) p=0,73	0,90 (0,48 – 1,71) p=0,75
	G- (CC)	Referência	Referência	Referência	Referência
Presença Alelo C	C- (GG)	Referência	Referência	Referência	Referência
	C+ (CC+CG)	2,44 (0,67 – 8,96) p=0,18	1,58 (0,41 – 6,12) p=0,51	2,85 (0,36 – 22,6) p=0,32	2,04 (0,24 – 17,28) p=0,51
<i>TNFSF11</i> (RANKL) (C/G) rs 2277438					
Genótipos	AA	Referência	Referência	Referência	Referência
	AG	1,38 (0,86 – 2,23) p=0,18	1,05 (0,63 – 1,75) p=0,84	1,6 (0,81 – 3,18) p=0,18	1,33 (0,67 – 2,64) p=0,4
	GG	0,54 (0,24 – 1,23) p=0,15	0,47 (0,19– 1,16) p=0,1	0,4 (0,1 – 1,73) p=0,22	0,49 (0,10 – 2,32) p=0,37
Presença Alelo A	A+ (AA+AG)	2,04 (0,92 – 4,52) p=0,08	2,15 (0,9 – 5,12) p=0,03	2,9 (0,7 – 12,1) p=0,14	2,24 (0,49 – 10,32) p=0,3
	A- (GG)	Referência	Referência	Referência	Referência
Presença Alelo G	G- (AA)	Referência	Referência	Referência	Referência
	G+ (AG+GG)	1,07 (0,68 – 1,69) p=0,77	0,83 (0,50 – 1,37) p=0,5	1,2 (0,62 – 2,34) p=0,58	1,1 (0,57 – 2,14) p=0,78

*Valores ajustados após análise conjunta com idade (ponto de corte de 16 anos), período extra-alveolar, meio de armazenamento e tempo de imobilização.

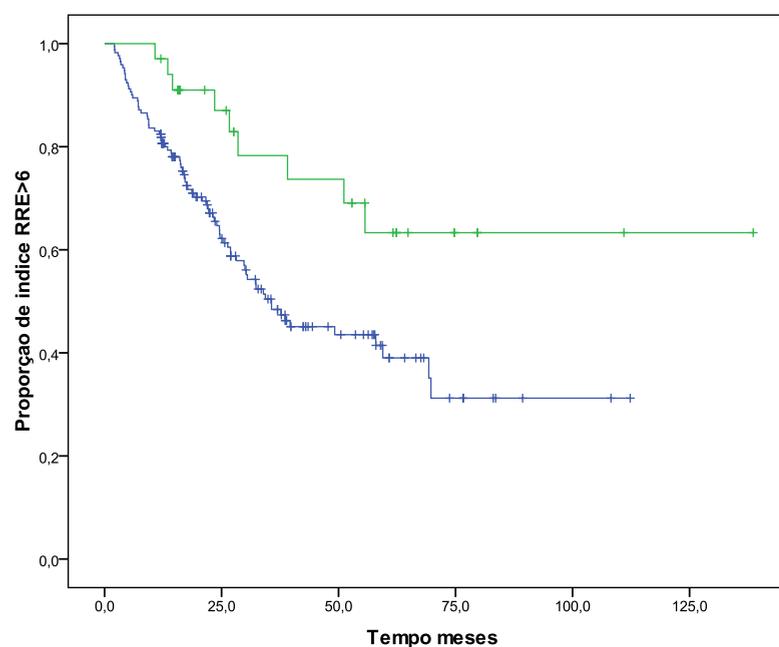
A tabela 18 apresenta o resultado da avaliação do efeito dos SNPs estudados no gene que codifica para a MMP2 na progressão das RRE na amostra como um todo e nos casos de RRES. A análise do SNP rs 2285053 no gene *MMP2* só foi realizada para os genótipos agrupados de acordo com a presença do alelo polimórfico devido ao pequeno número de homozigotos polimórficos (1 paciente). Para os outros SNPs os genótipos foram avaliados individualmente, agrupados de acordo com o alelo ancestral e agrupados de acordo com o alelo polimórfico. Não foram observadas diferenças significativas na progressão das RRE quando avaliados os SNPs rs 243565 e rs 243566 e rs 2285053 no gene *MMP2*.

Tabela 18 –Análise da associação entre os genótipos dos SNPs estudados no gene *MMP2* e a progressão de RRE final

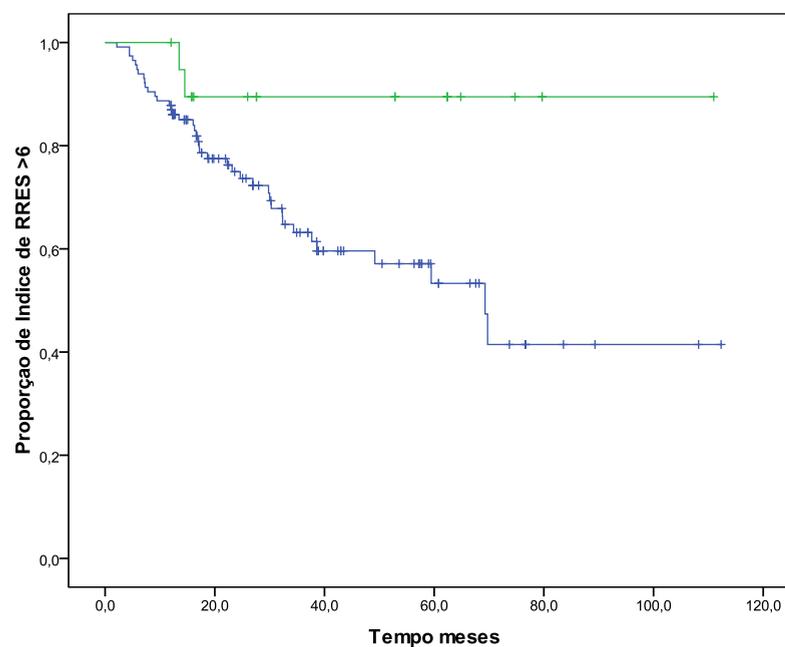
Polimorfismos		RREI+RRES+Mista		RRES	
		RTF (IC95%) p		RTF (IC95%) p	
		Univariada	Multivariada*	Univariada	Multivariada
<i>MMP2</i> (-735C/T) rs 2285053					
Genótipos	CC				
	CT				
	TT				
Presença Alelo C	C+ (CC+CT) G- (TT)				
Presença Alelo T	T- (CC) T+ (CT+TT)	Referência 1,03 (0,6 – 1,76) p=0,93	Referência 1,21 (0,66 – 2,20) p=0,54	Referência 0,99 (0,48 – 62,06) p=0,97	Referência 0,99 (0,44 – 2,23) p=0,98
<i>MMP2</i>(-1306C/T) rs 243865					
Genótipos	CC	Referência 0,73 (0,38 – 1,39) p=0,34	Referência 0,73 (0,38 – 1,44) p=0,37	Referência 0,52 (0,2 – 1,37) p=0,18	Referência 0,51 (0,2 – 1,3) p=0,16
	CT				
	TT	1,63 (0,56 – 4,73) p=0,37	1,97 (0,77 – 5,02) p=0,15	1,19 (0,33 – 4,32) p=0,8	1,08 (0,38 – 3,09) p=0,88
Presença Alelo C	C+ (CC+CT) G- (TT)	Referência 0,58 (0,20 – 1,67) p=0,31	0,48 (0,19 – 1,21) p=0,12 Referência	0,74 (0,21 – 2,67) p=0,65 Referência	0,82 (0,29 – 2,32) p=0,70 Referência
Presença Alelo T	T- (CC) T+ (CT+TT)	Referência 0,89 (0,5 – 1,58) p=0,7	Referência 0,95(0,53 – 1,69) p=0,86	Referência 0,66 (0,29 – 1,49) p=0,31	Referência 0,63 (0,3 – 1,35) p=0,24
<i>MMP2</i> (-1557 A/G) rs 243866					
Genótipos	AA	Referência 0,75 (0,12 – 4,66) p=0,76	Referência 0,99 (0,17 – 5,67) p=0,99	Referência 0,32 (0,06 – 1,9) p=0,21	Referência 0,54 (0,12 – 2,53) p=0,43
	AG				
	GG	1,0 (0,18 – 5,73) p=0,99	1,38 (0,27 – 6,97) p=0,7	0,59 (0,12 – 2,96) p=0,52	0,95 (0,26 – 3,49) p=0,93
Presença Alelo A	A+ (AA+AG) A- (GG)	Referência 0,76 (0,39 – 1,49) p=0,43	0,72 (0,36 – 1,42) p=0,34 Referência	0,61 (0,25 – 1,47) p=0,27 Referência	0,861 (0,26 – 1,44) p=0,26 Referência
Presença Alelo G	G- (AA) G+ (AG+GG)	Referência 0,94 (0,17 – 5,33) p=0,94	Referência 1,3 (0,25 – 6,72) p=0,76	Referência 0,51 (0,10 – 2,52) p=0,41	Referência 0,89 (0,13 – 6,26) p=0,9

*Valores ajustados após análise conjunta com idade (ponto de corte de 16 anos), período extra-alveolar, meio de armazenamento e tempo de imobilização

Na figura 8 são apresentadas as curvas de sobrevida que ilustram a taxa de progressão da RRE, de acordo com a idade no momento do trauma considerando-se o ponto de corte de 16 anos. Observa-se que em ambos gráficos os pacientes com idade inferior a 16 anos atingem o índice 6 mais rapidamente do que aqueles com idade superior a 16 anos.



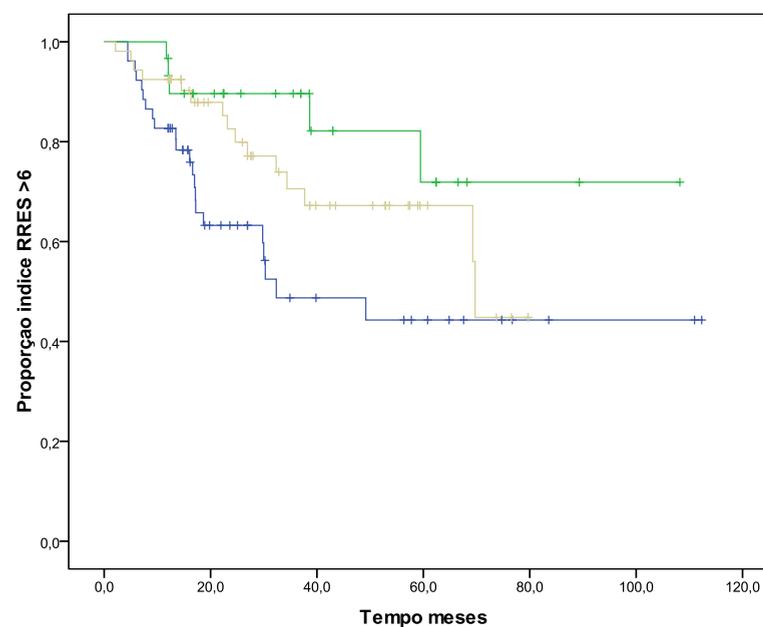
A



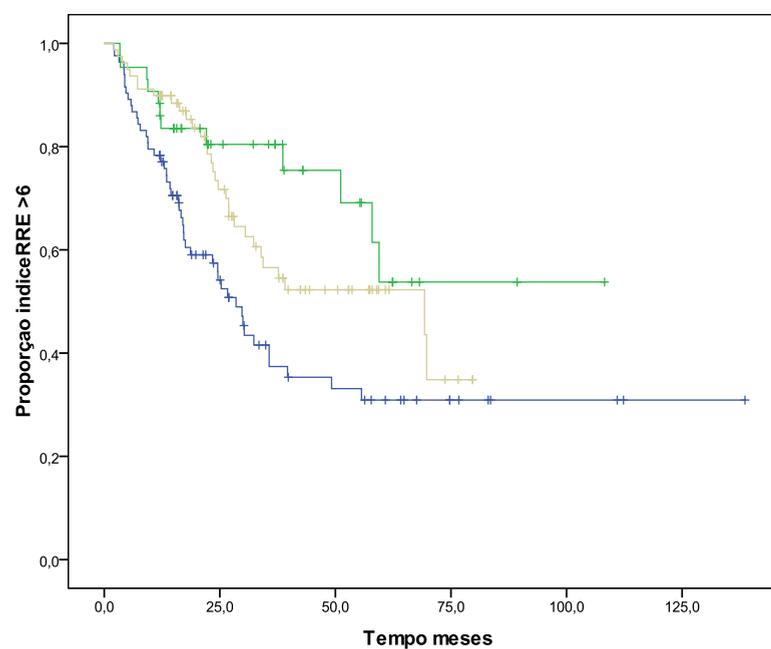
B

Figura 8: Curva de Kaplan-Meier ilustrando a taxa de progressão da RRE e RRES de acordo com a idade no momento do trauma considerando-se o ponto de corte de 16 anos (≤ 16 anos, > 16 anos) na amostra como um todo (A) e na subamostra composta pelos casos de RRES final (B).

Na figura 9 são apresentadas as curvas de sobrevida que ilustram a taxa de progressão da RRE, de acordo com o meio de armazenamento. Aqueles pacientes que armazenaram o dente avulsionado em meio seco atingiram o índice 6 mais rápido do que dentes armazenados em meios úmidos (água, soro ou saliva) ou no leite.



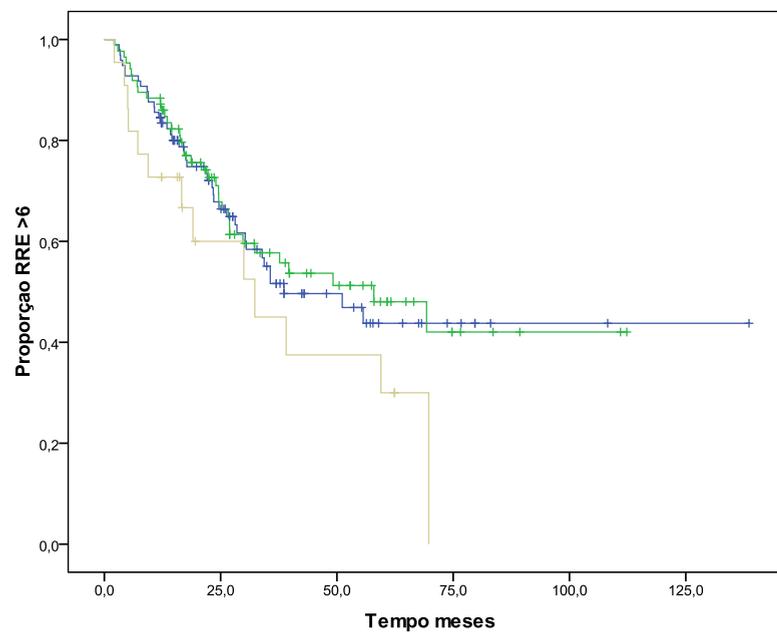
A



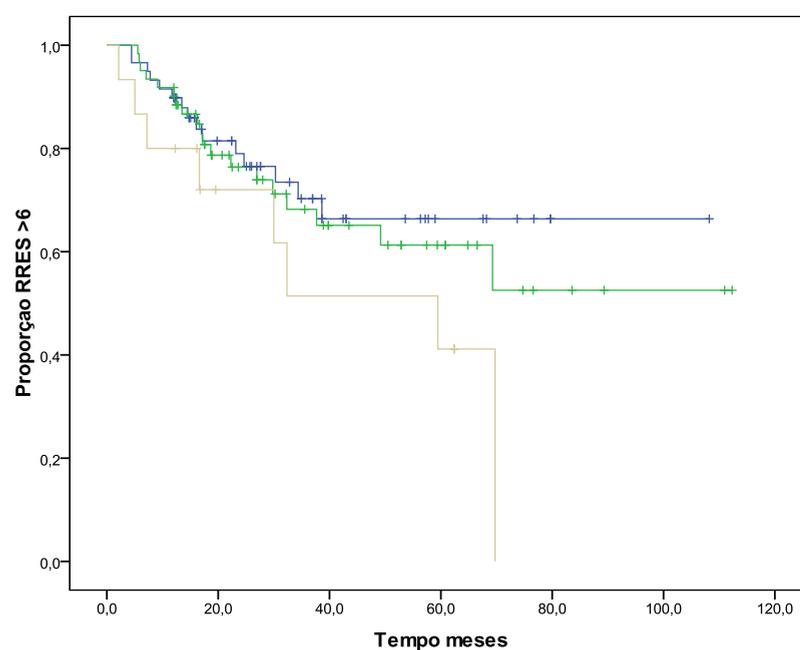
B

Figura 9: Curva de Kaplan-Meier ilustrando a taxa de progressão da RRE e RRES de acordo com o meio de armazenamento (— Seco, — Úmido, — Leite), na amostra como um todo (A) e na subamostra composta pelos casos de RRES final (B).

Na figura 10 são apresentadas as curvas de sobrevida que ilustram a taxa de progressão da RRE, de acordo com os genótipos do SNP rs1800587 no gene *IL1A*. Dentes de pacientes portadores do genótipo TT apresentaram evolução mais rápida da RRE e RRES.



A



B

Figura 10: Curva de Kaplan-Meier ilustrando a taxa de progressão da RRE e RRES de acordo com os genótipos do SNP rs 1800587 no gene *IL1A* (___TT, ___ CC ___ CT) na amostra como um todo (A) na subamostra composta pelos casos de RRES final (B).

Na figura 11 são apresentadas as curvas de sobrevida que ilustram a taxa de progressão da RRE, de acordo com os genótipos do SNP rs 419598 no gene *IL1RN*. Dentes de pacientes portadores dos genótipos CC apresentaram taxa de progressão da RRE e RRES mais lentas.

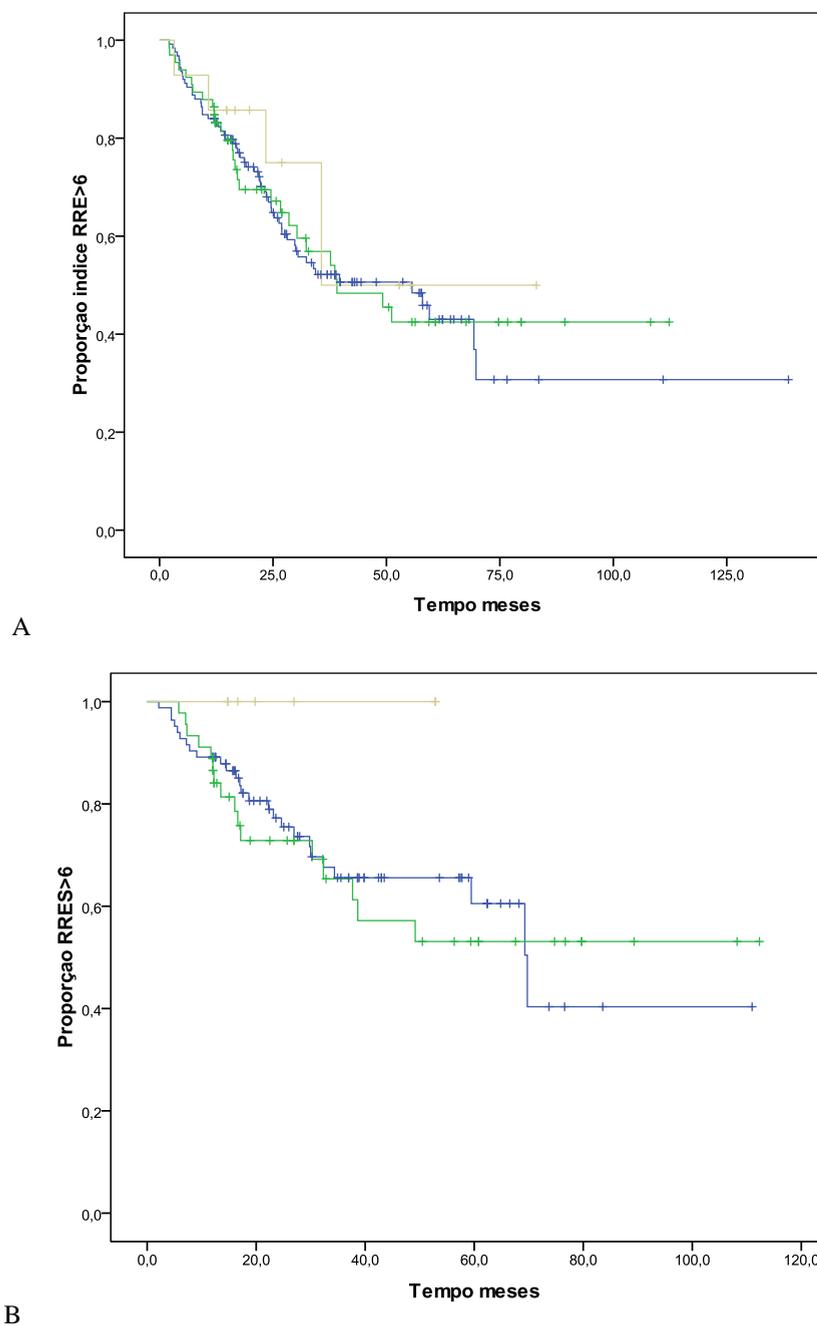


Figura 11: Curva de Kaplan-Meier ilustrando a taxa de progressão da RRE e RRES de acordo com os genótipos do SNP rs 419598 no gene *IL1RN* (___ CC, ___ TT ___ CT) na amostra como um todo (A) na subamostra composta pelos casos de RRES final (B).

5.4 Estudo da expressão de fatores locais no tecido perirradicular de dentes reimplantados portadores de RRE

5.4.1 Dados descritivos da subamostra utilizada para a quantificação de citocinas, quimiocinas e metaloproteinases

Para avaliação da expressão de fatores locais nos tecidos perirradiculares de dentes portadores de reabsorções radiculares externas pós-traumáticas foram utilizados 63 dentes com indicação de exodontia, provenientes de 56 pacientes, 42 do sexo masculino (75%) e 14 do sexo feminino (25%) em tratamento na CTD-FO-UFMG. A idade dos pacientes no momento do trauma variou de 6,9 a 18,3 anos (média de 11,1 anos \pm 2,8). A idade dos pacientes no momento da extração variou de 8,2 a 25,2 anos (média de 14,4 anos \pm 3,3). O período médio de permanência dos dentes reimplantados foi de 3,5 anos \pm 1,6 (min de 8,9 meses e máximo de 8,5 anos). O grupo controle constituiu-se de cinco voluntários saudáveis (4 do sexo feminino e 1 do sexo masculino), em tratamento na Clínica de Ortodontia da FO-UFMG, portadores de 16 pré-molares hígidos, com rizogênese completa, em oclusão normal, sem alterações periapicais ou periodontais e com indicação ortodôntica para exodontia. A idade média dos pacientes do grupo controle foi de 13,4 anos \pm 1,8).

Para o estudo da expressão de citocinas a amostra foi classificada de acordo com o tipo de reabsorção observado no exame radiográfico realizado na data da extração, de acordo com critérios definidos na literatura (ANDREASEN et al., 1995b). Observa-se no **gráfico 4** que, segundo o critério radiográfico, o grupo de estudo foi constituído de 22 dentes portadores de Reabsorções Radiculares Externas Inflamatórias - RREI(34,9%), 24 casos de Reabsorções Radiculares Externas por Substituição – RRES (38,0%) e 17 casos portadores de reabsorções mistas (27,0%).

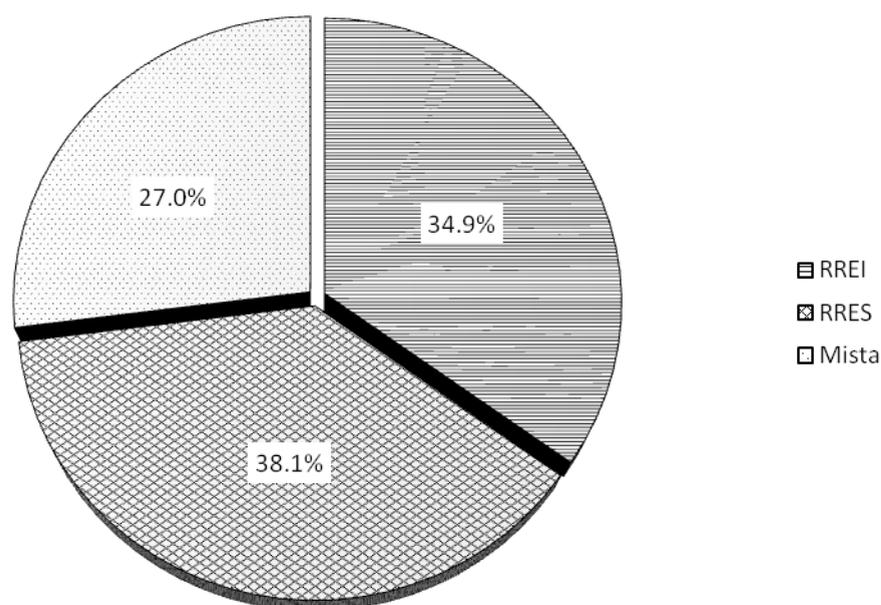


Gráfico 4: Distribuição da subamostra utilizada para quantificação de citocinas quimiocinas e metaloproteinases segundo o tipo de RRE observada na data da extração

A distribuição da amostra de acordo com o índice de reabsorção radicular observado no momento da extração é apresentada no **gráfico 5**. Observa-se que a grande maioria da amostra utilizada para o estudo da expressão de citocinas apresentava índices de reabsorção superiores a 6 (77,7%).

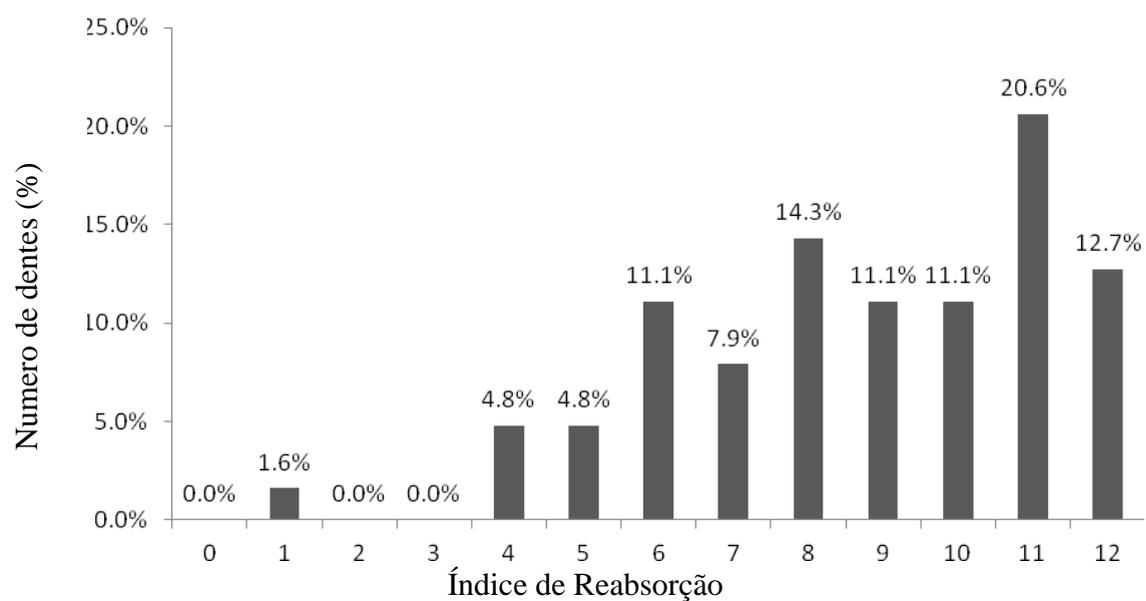


Gráfico 5: Distribuição da subamostra utilizada para quantificação de citocinas quimiocinas e metaloproteinases segundo o índice de RRE observada na data da extração

5.4.2 Expressão de citocinas, quimiocinas e metaloproteinases nos tecidos perirradiculares de dentes portadores de diferentes padrões radiográficos de RRE

Os níveis mínimo, máximo, médio e mediano de detecção para as citocinas, quimiocinas e metaloproteinases estudadas foram expressos como pg/100mg de tecido e são apresentados na tabela 19.. Valores abaixo do limite de detecção foram considerados zero. De acordo com os valores de p obtidos para o teste de Kolmogorov-Smirnov observa-se que a concentração da maioria das citocinas não apresentou distribuição normal ($p < 0.05$). Sendo assim, para efeito das comparações estatísticas estas variáveis sofreram transformação logarítmica. As medias logarítmicas dos níveis das citocinas, quimiocinas e MMPs estudadas foram comparados entre os três grupos portadores de RREI, RRES e reabsorções mistas e entre os grupos amostrais e o grupo controle, sem reabsorção, utilizando-se o modelo de regressão linear.

Tabela 19: Concentração das citocinas, quimiocinas e metaloproteinases no conjunto de dentes portadores de RRE e no grupo controle sem RRE

Citocina	Grupo	Min	Max	Média (\pm DP)	Mediana	Kolmogorov-Smirnov
IL-1 β	Controle	0,00	3182,22	687,34 \pm 1227,59	21,04	P < 0.05
	Experimental	0,00	18840,71	535,78 \pm 2397,14	57,60	
IL-1RA	Controle	16,99	16091,30	3432,77 \pm 3937,33	2505,58	P < 0.05
	Experimental	0,00	45011,52	11371,55 \pm 11068,16	7975,84	
IL-4	Controle	0,00	86,66	34,51 \pm 25,75	35,83	P < 0.05
	Experimental	0,00	22,39	1,77 \pm 3,04	1,38	
IL-6	Controle	2,49	14,48	4,92 \pm 2,86	4,34	P < 0.05
	Experimental	0,00	690,36	108,5 \pm 135,42	62,49	
IL-8	Controle	0,00	162,79	45,66 \pm 48,70	22,65	P < 0.05
	Experimental	1,51	4331,42	856,26 \pm 972,44	561,59	
IL-10	Controle	0,00	6,27	1,18 \pm 2,17	0,00	P > 0.05
	Experimental	0,00	9,30	5,03 \pm 1,91	4,92	
IL-17A	Controle	0,00	59,04	22,53 \pm 16,45	23,02	P > 0.05
	Experimental	0,00	77,19	42,82 \pm 15,60	43,05	
MMP2	Controle	2337,89	28093,40	8211,7 \pm 9304,28	3605,07	P < 0.05
	Experimental	0,00	30162,68	7715,24 \pm 7471,53	5595,38	
MMP9	Controle	0,00	2217,77	470,22 \pm 822,66	0,00	P < 0.05
	Experimental	0,00	11710,07	1313,94 \pm 2026,20	599,95	
IFN γ	Controle	4,80	37,25	13,03 \pm 9,07	8,9	P < 0.05
	Experimental	0,793	13,85	5,98 \pm 2,23	5,88	
TNF α	Controle	0,00	6,72	1,90 \pm 2,65	0,00	P < 0.05
	Experimental	0,00	13,40	4,81 \pm 3,15	5,24	
TGF β	Controle	0,00	6294,98	2082,28 \pm 1422,83	1753,02	P < 0.05
	Experimental	0,00	36181,63	7299,02 \pm 7616,77	5062,8	
CCL2	Controle	24,01	192,56	80,29 \pm 44,32	78,12	P < 0.05
	Experimental	0,00	677,51	78,63 \pm 87,63	68,41	
CCL3	Controle	14,68	67,23	36,26 \pm 15,62	35,23	P < 0.05
	Experimental	0,00	554,21	85,58 \pm 106,63	38,27	
CCL5	Controle	461,43	3182,22	1826,60 \pm 749,79	1772,88	P < 0.05
	Experimental	0,00	19174,02	5120,6 \pm 4648,48	4985,18	
RANK	Controle	216,88	2464,93	625,85 \pm 642,77	324,41	P > 0.05
	Experimental	0,00	5649,61	1265,34 \pm 1078,36	997,1	
OPG	Controle	452,37	1486,35	899,07 \pm 262,4	903,18	P < 0.05
	Experimental	78,37	11546,81	1989,55 \pm 1964,87	1419,12	

A figura 12 apresenta os gráficos representativos dos níveis de IL-1 β e TNF- α no grupo controle, livre de reabsorções e nos grupos amostrais com diferentes padrões radiográficos RRE. Observa-se que os níveis de IL-1 β foram significativamente mais altos nas reabsorções inflamatórias e mistas quando comparadas com as reabsorções por substituição. A concentração de TNF α foi significativamente maior nos dentes portadores dos três tipos de reabsorção estudados quando comparados ao grupo controle. Considerando-se o tipo de reabsorção, o grupo com reabsorções inflamatórias apresentou índices de TNF α significativamente maiores quando comparado aos grupos com reabsorções por substituição ou mistas.

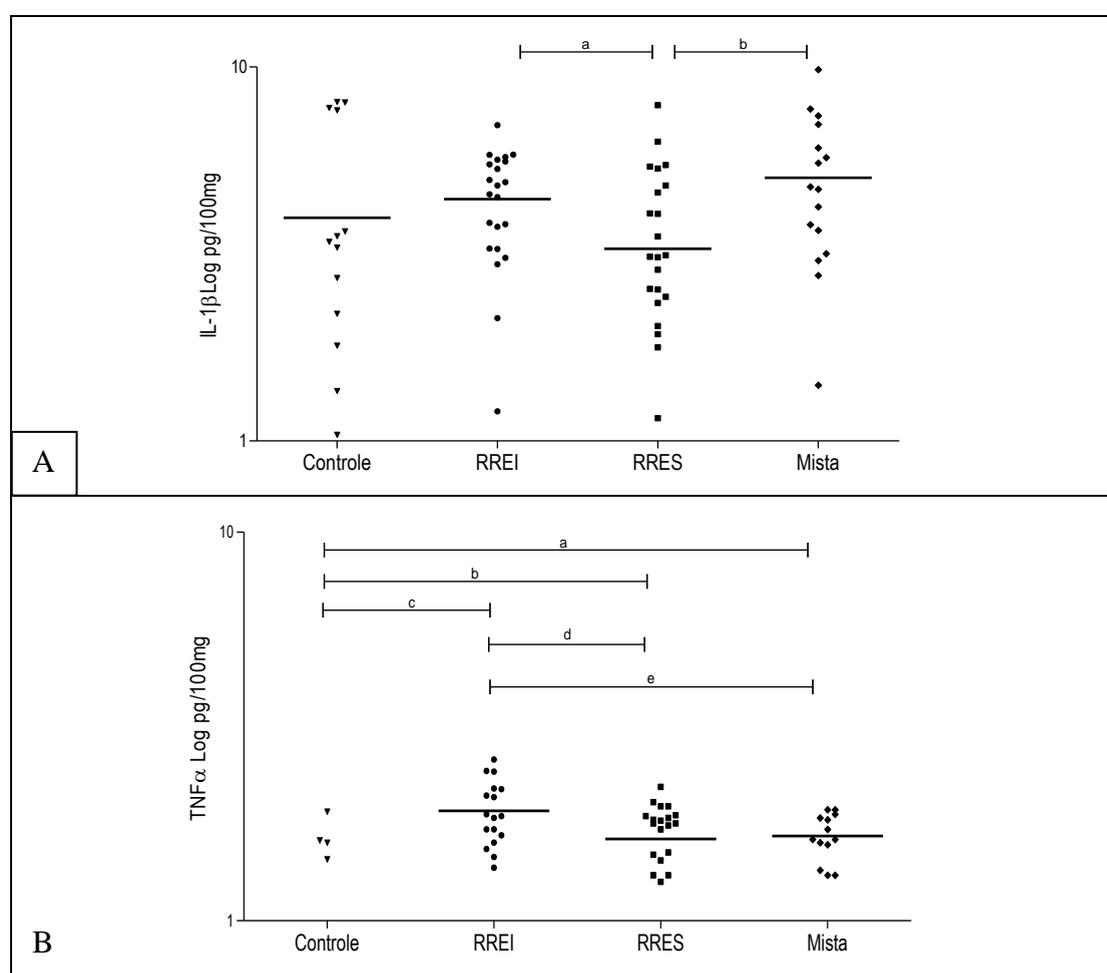


Figura12: **A-** Comparação dos níveis de IL-1 β Log entre (a) RREI x RRES $p=0.02$; comparação dos níveis de IL-1 β Log entre (b) reabsorções mistas x RRES $p=0.01$. **B-** Comparação dos níveis de TNF α Log entre (a) reabsorções mistas e o grupo controle $p<0,001$; (b) comparação entre RRES e o grupo controle $p<0,001$; (c) comparação entre RREI e o grupo controle $p=0,0018$; (d) comparação entre RREI x RRES $p<0,001$; (e) comparação entre RREI e reabsorções e mistas $p=0,03$.

Na figura 13 são apresentados os gráficos representativos dos níveis de IL-6, IL-17A e IFN γ . Observa-se que não houve diferença significativa nos níveis de nenhuma das três citocinas quando comparados os diferentes tipos de reabsorção entre si. Quando comparados com controles sem reabsorção, os níveis de IL-6 e IFN γ foram significativamente maiores nos dentes com reabsorção, independentemente do tipo.

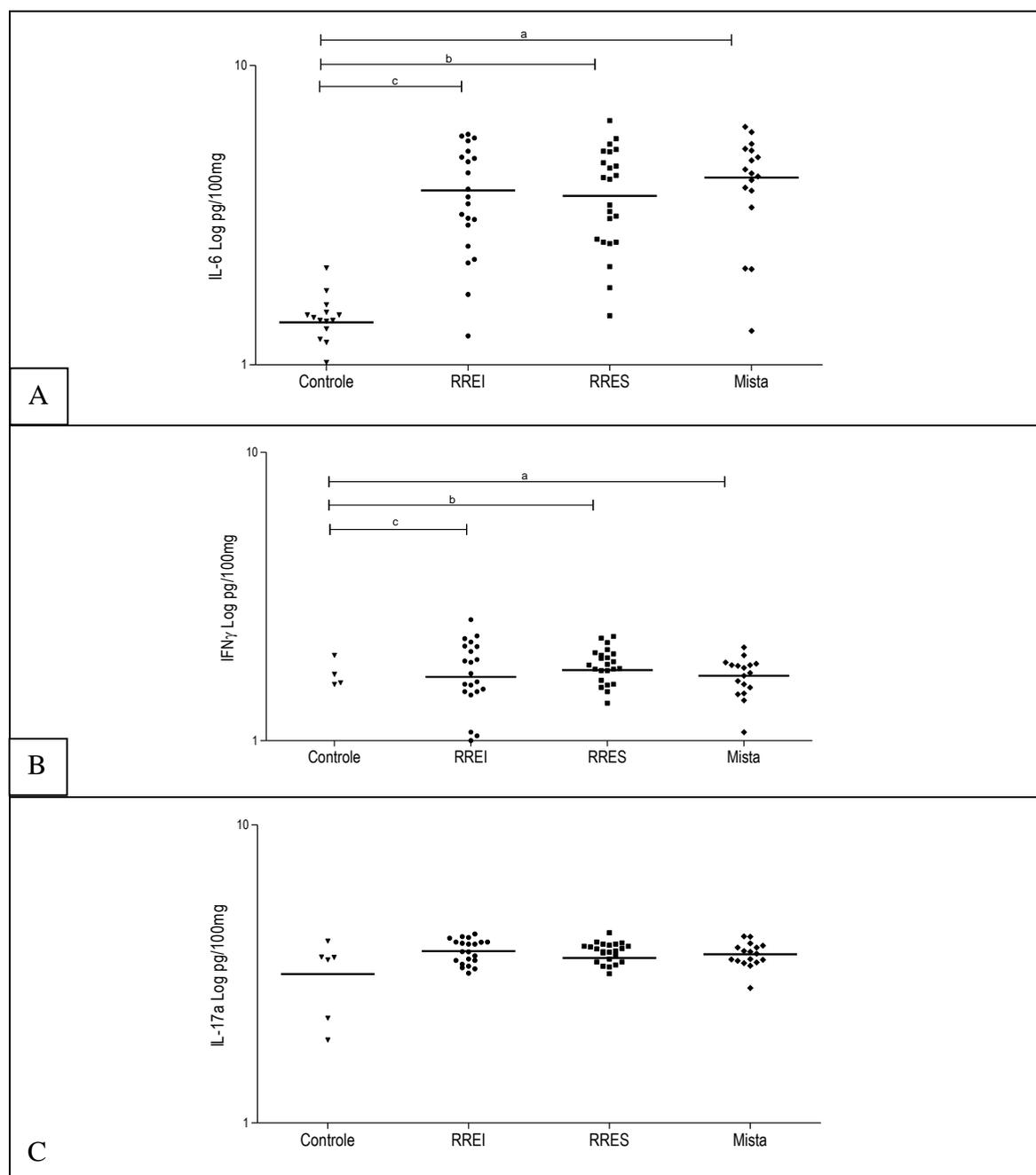


Figura13: **A-** Comparação dos níveis de IL-6 Log entre (a) reabsorções mistas e o grupo controle $p < 0,001$; (b) comparação entre RRES e o grupo controle $p < 0,001$; (c) comparação entre RREI e o grupo controle $p < 0,001$. **B-** Comparação dos níveis de IFN γ Log entre (a) reabsorções mistas e o grupo controle $p < 0,001$; (b) comparação entre RRES e o grupo controle $p < 0,0001$; (c) comparação entre RREI e o grupo controle $p < 0,0001$. **C** – Comparação dos níveis de IL-17A Log entre o grupo controle e os grupos portadores de RREI, RRES e reabsorções mistas.

Na figura 14 são apresentados os gráficos representativos dos níveis de IL-1RA, TGF β , IL-10 e IL-4 no grupo controle, livre de reabsorções e nos grupos amostrais. Observa-se que as concentrações de IL-1RA foram significativamente maiores nos grupos com RREI e reabsorções e mistas do que no grupo controle, sem reabsorção. A concentração de TGF β foi significativamente maior nos dentes portadores de reabsorção mistas e por substituição quando comparados ao grupo controle. Para o grupo com reabsorções inflamatórias esta diferença ficou no limiar de significância estatística. Os níveis de IL-4 foram significativamente maiores no grupo controle quando comparado aos grupos de estudo considerando o tipo de reabsorção. Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de IL-10 quando comparados os dentes portadores de reabsorção com os controles saudáveis sem reabsorção ou quando comparados os diferentes tipos de reabsorção entre si.

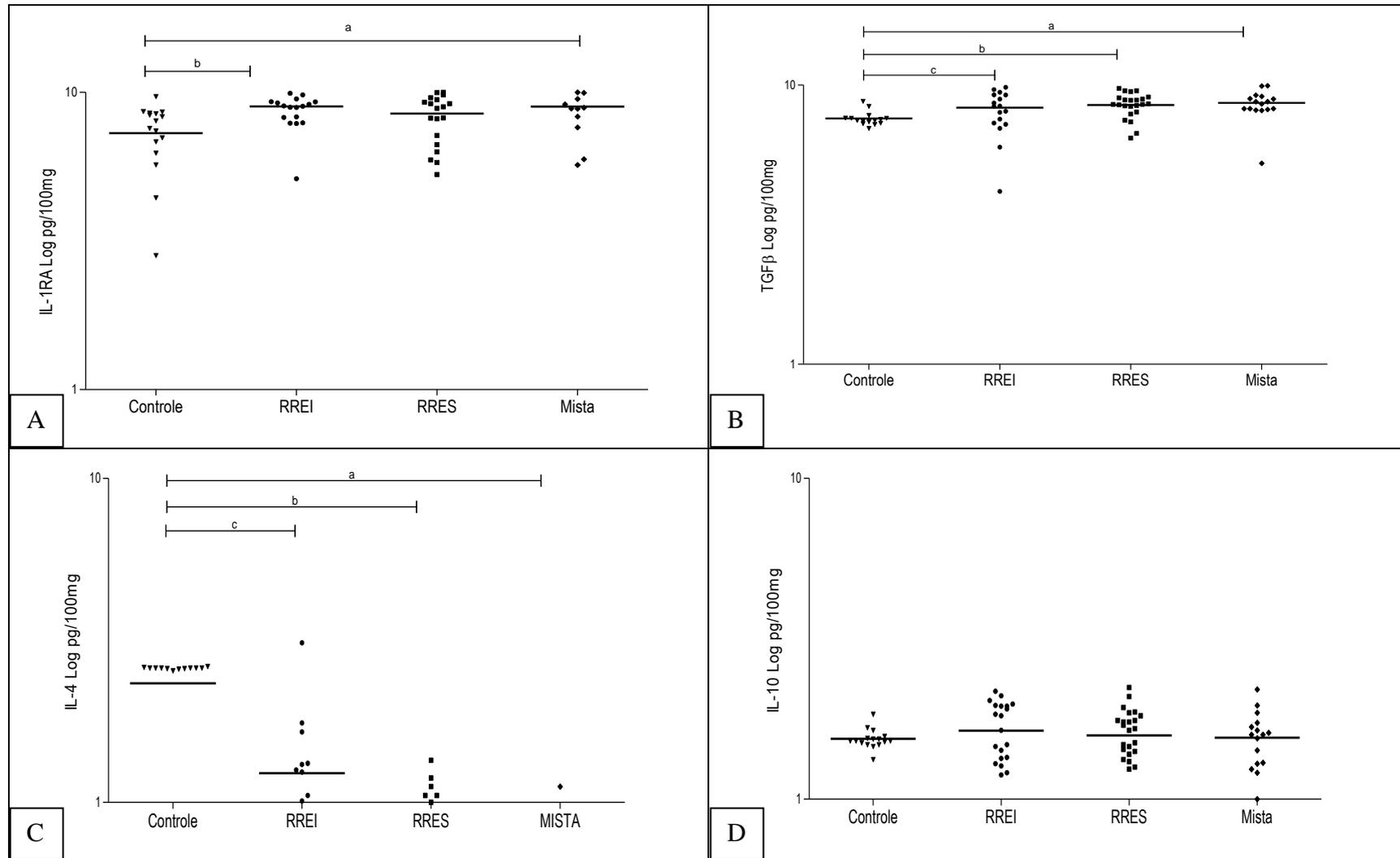


Figura14: **A-** Comparação dos níveis de IL-1RA Log entre (a) reabsorções mistas e o grupo controle $p=0,02$; (b) comparação dos níveis de IL-1RA Log entre RREI e o grupo controle $p=0,004$. **B-** Comparação dos níveis de TGFβ Log entre (a) reabsorções mistas e o grupo controle $p<0,001$; (b) comparação entre RRES e o grupo controle $p<0,0001$; (c) comparação entre RREI e o grupo controle $p=0,05$. **C-** Comparação dos níveis de IL-4 Log entre (a) reabsorções mistas e o grupo controle $p<0,001$; (b) comparação entre RRES e o grupo controle $p<0,0001$; (c) comparação entre RREI e o grupo controle $p<0,001$. **D** – Comparação dos níveis de IL-10 Log entre o grupo controle e os grupos portadores de RREI, RRES e reabsorções mistas.

Na figura 15 são apresentados os gráficos representativos dos níveis de OPG e RANK no grupo controle, livre de reabsorções e nos grupos amostrais. Observa-se os níveis destas citocinas foram significativamente maiores nos dentes portadores de RREI e reabsorções mistas quando comparados ao grupo controle, sem reabsorção. Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de OPG e RANK entre o grupo portador de RRES e o grupo controle tampouco entre os grupos amostrais entre si.

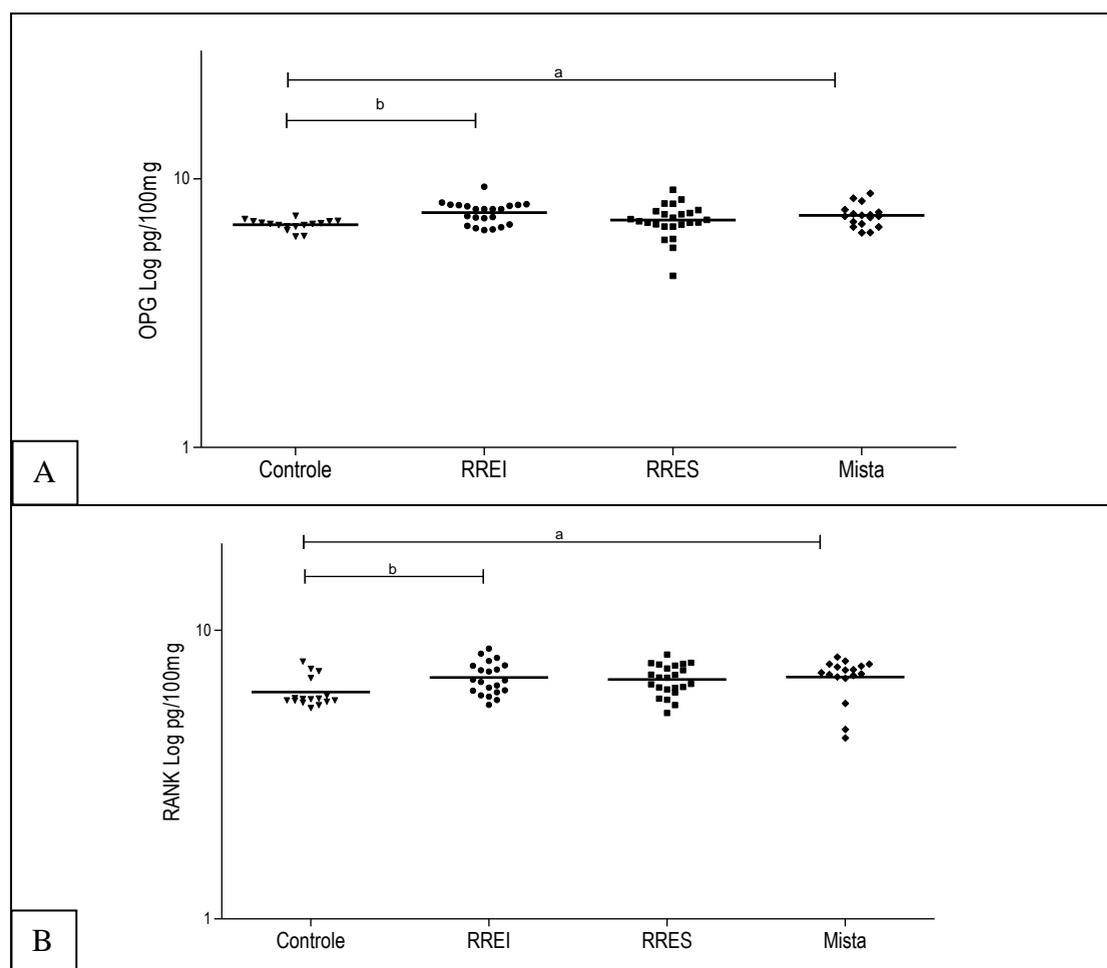


Figura15: Comparação dos níveis de OPG Log entre (a) reabsorções mistas e o grupo controle $<0,001$; comparação dos níveis de OPG Log entre (b) RREI e o grupo controle $P<0,001$. B- Comparação dos níveis de RANKLog entre (a) reabsorções mistas e o grupo controle $p<0,048$; comparação entre (b) RREI e o grupo controle $p=0,03$.

Na figura 16 são apresentados os gráficos representativos dos níveis das quimiocinas estudadas. Observa-se dentes portadores de reabsorção apresentaram níveis significativamente maiores de IL-8 quando comparados aos controles independentemente do tipo de reabsorção. Além disso, os níveis de IL-8 foram significativamente maiores nas reabsorções mistas quando comparadas com as reabsorções inflamatórias e por substituição. Os níveis de CCL5 foram significativamente maiores nos dentes portadores de reabsorções por substituição e mistas quando comparados com o grupo controle sem reabsorção. Não houve diferença significativa quando comparado o grupo com reabsorção inflamatória e o grupo controle nem quando comparados os 3 tipos de reabsorção entre si

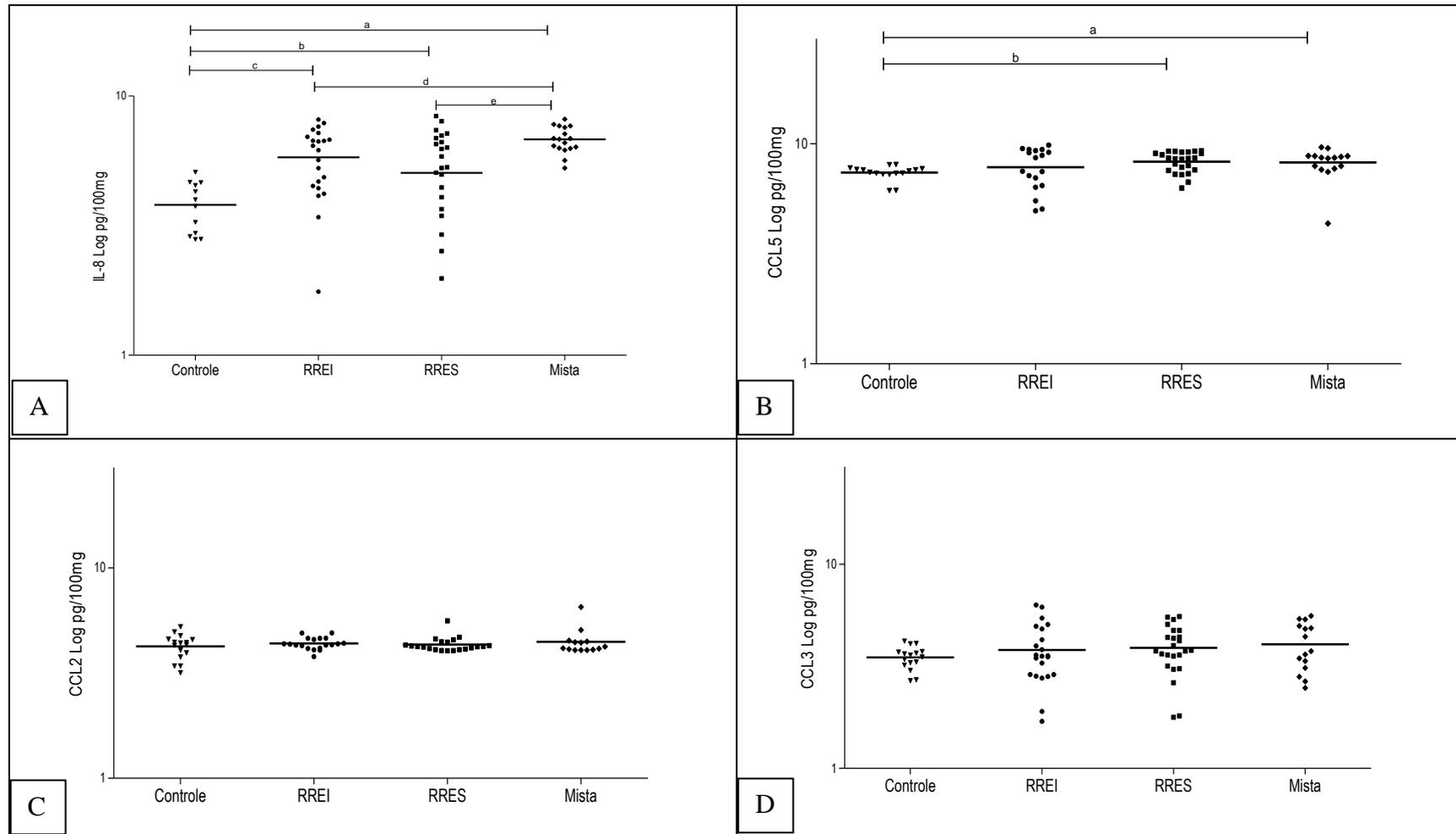


Figura 16: **A-** Comparação dos níveis de IL-8 Log entre (a) reabsorções mistas e o grupo controle $p < 0,001$; comparação entre (b) RRES e o grupo controle $p = 0,02$; comparação entre (c) RREI e o grupo controle $p < 0,001$; comparação entre (d) RREI e reabsorções mistas $p = 0,01$; comparação entre (e) RRES e reabsorções mistas $p < 0,001$. **B-** Comparação dos níveis de CCL5 Log entre (a) reabsorções mistas e o grupo controle $p = 0,02$; comparação entre (b) RRES e o grupo controle $p < 0,0001$. **C-** Comparação dos níveis de CCL2 Log entre o grupo controle e os grupos portadores de RREI, RRES e reabsorções mistas. **D-** Comparação dos níveis de CCL3 Log entre o grupo controle e os grupos portadores de RREI, RRES e reabsorções mistas.

Na figura 17 são apresentados os gráficos representativos dos níveis das MMPs estudadas. Quando comparados os três tipos de reabsorção entre si, os níveis de MMP2 foram significativamente maiores no grupo com reabsorção por substituição em relação aos grupos com reabsorções inflamatórias e mistas e ao grupo controle. Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de MMP9 quando comparados os grupos amostrais entre si nem quando comparados com o grupo controle livre de reabsorção.

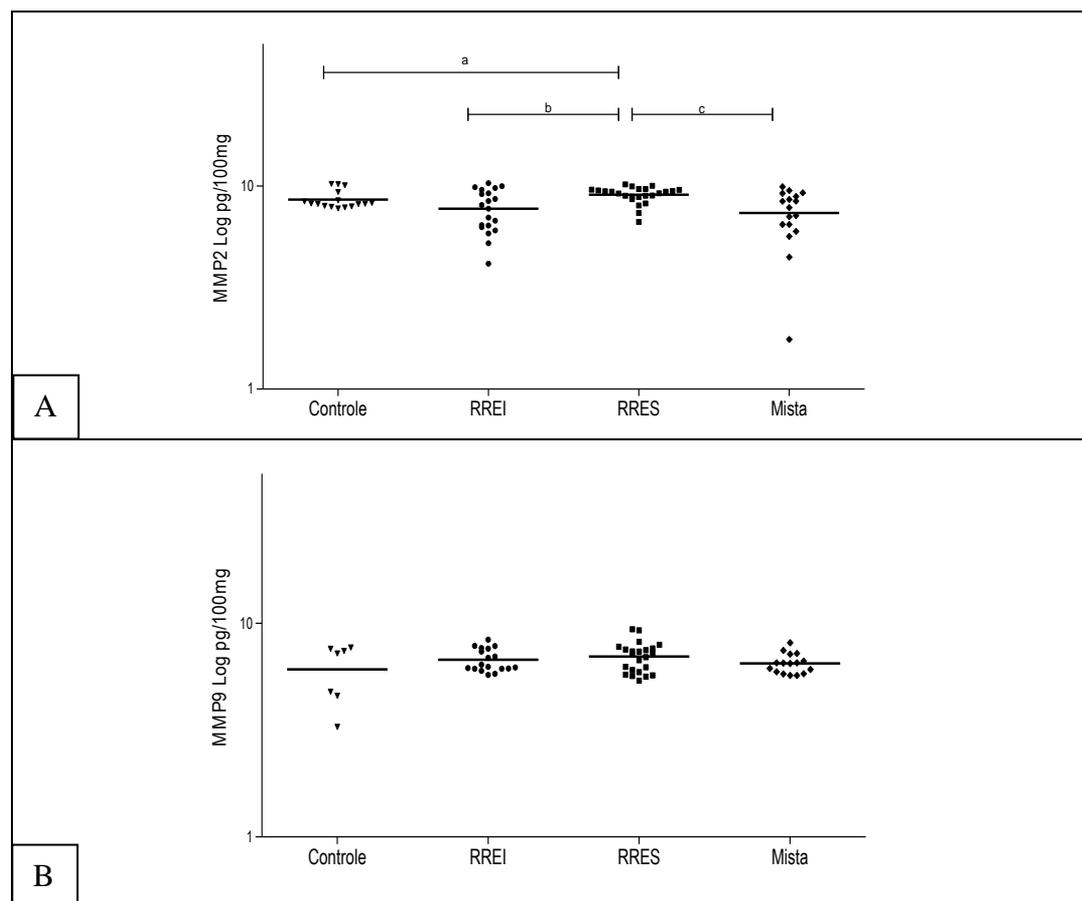


Figura17: Comparação dos níveis de MMP2Log entre (a) reabsorções mistas e o grupo controle $p=0,04$; (b) comparação entre RRES e RREI $p<0,001$; (c) comparação entre RREI e reabsorções mistas $p<0,001$. B- Comparação dos níveis de MMP9Log entre o grupo controle e os grupos portadores de RREI, RRES e reabsorções mistas.

6- DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A avulsão dentária consiste no completo deslocamento do dente de seu alvéolo resultando na ruptura total das fibras do ligamento periodontal, danos à camada cementoblástica e no rompimento do feixe vâsculo-nervoso periapical e consequente interrupção do aporte sanguíneo pulpar. O reimplante dentário, definido como o reposicionamento de um dente avulsionado em seu alvéolo, tem sido aceito como o tratamento de escolha das avulsões dentárias, embora seu prognóstico no longo prazo seja imprevisível (ANDERSSON et al., 2012). Enquanto alguns dentes podem permanecer em funcionamento durante décadas, muitos são perdidos levando a consequências funcionais, estéticas, psicológicas e econômicas relevantes, principalmente para a faixa etária mais acometida, crianças e adolescentes (CORTES et al., 2002; NGUYEN et al., 2004; MARCENES e RYDÅ, 2007). A cicatrização após um reimplante dentário está diretamente relacionada à manutenção da viabilidade do LP remanescente na superfície radicular do dente avulsionado (ANDREASEN, 1981c; ANDRESEN e KRISTERSON, 1981, LINDSKOG et al., 1985). Como as células do LP que permanecem na raiz após a avulsão são privadas do suprimento sanguíneo e logo consomem seus metabólitos armazenados, a necrose do LP resulta mais das condições de manutenção do dente avulsionado durante o período extra-alveolar do que propriamente da lesão tecidual que ocorre durante o deslocamento do dente (HAMMARSTRÖM et al., 1986a). Fatores como a idade, condições de armazenamento e duração do período extra-alveolar do dente avulsionado bem como o tratamento de urgência da avulsão tem sido implicados no prognóstico dos reimplantes dentários no longo prazo e foram utilizados como base para a elaboração de protocolos para atendimento das lesões traumáticas como, por exemplo, o divulgado pela Associação Internacional de Traumatologia Dentária – *IADT* (ANDERSSON et al., 2012). Em que pese o fato destes protocolos se basearem nas melhores evidências disponíveis, deve-se reconhecer que a grande maioria dos procedimentos propostos se baseia em estudos experimentais, realizados em animais, uma vez que a literatura clínica relativa aos reimplantes dentários ainda é dominada por estudos de baixo poder de evidência científica tais como relato de casos, série de casos e estudos transversais retrospectivos. Estudos clínicos randomizados, embora ideais, não são viáveis em pacientes portadores de lesões traumáticas dentárias (LTD), devido a razões éticas. Este fato reforça a importância de estudos clínicos longitudinais não randomizados em humanos para avaliação das condutas propostas a partir de evidências experimentais (ANDREASEN et al., 2012). Estudos desta natureza podem se constituir em importante ferramenta desde que

recebam um tratamento estatístico adequado e que fatores de confusão possam ser controlados (ANDREASEN et al., 2012). Neste contexto, o presente estudo traz uma importante contribuição para a literatura odontológica tendo em vista o tamanho da amostra, constituída de 205 dentes reimplantados em 165 pacientes. Com exceção do estudo prospectivo realizado por Andreasen et al. (1995a; 1995b), no qual foram avaliados 400 dentes (272 dentes para a análise multivariada), a maioria dos acompanhamentos clínicos de dentes avulsionados foi realizada com amostras relativamente pequenas, geralmente inferiores a 50 dentes (ANDERSSON et al., 1989; ANDERSSON e BODIN, 1990; MACKIE e WORTHINGTON, 1992; SCHATZ et al., 1995; BARRETT e KENNY, 1997b; BOYD et al, 2000; POHL et al., 2005a; 2005b; 2005c; CHAPPUIS e Von ARX, 2005; PETROVIC et al., 2010; RHOUMA et al., 2012). Devido à característica retrospectiva da maioria dos levantamentos, outra limitação frequentemente encontrada na literatura clínica é a falta de padronização dos procedimentos adotados durante o reimplante bem como no registro de informações. Estas dificuldades foram contornadas no presente estudo, uma vez que os dois centros envolvidos no atendimento dos pacientes integrantes da amostra atual (Pronto Socorro Odontológico do Hospital Municipal Odilon Bherens - 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) integram o Programa Traumatismos Dentários da FO-UFMG e adotaram protocolos e formulários comuns desde 1994. Cabe aqui ressaltar que nem todos os procedimentos indicados nos protocolos mais recentes da *IADT* (FLORES et al., 2007; ANDERSSON et al., 2012) eram indicados no período inicial de abrangência do estudo (1994 a 2010). Entretanto, este fato não invalida os resultados atuais uma vez que as manobras adotadas para a realização do reimplante foram rigorosamente as mesmas para toda a amostra, permitindo desta forma reduzir a possibilidade de viés no delineamento do estudo, de acordo com o postulado por Andreasen et al. (2012). O fato da CTD-FO-UFMG funcionar de forma permanente desde 1986 e representar um centro de referência para pacientes portadores de LTD no município de Belo Horizonte permitiu reunir uma amostra significativa mesmo após a adoção de rígidos critérios de inclusão que contemplavam a padronização dos procedimentos durante o reimplante, dos dados clínicos disponíveis e das radiografias utilizadas para diagnóstico da atividade de reabsorção além dos outros critérios descritos na metodologia.

As Equações de Estimação Generalizadas (GEE) foram adotadas neste estudo, com matriz de simetria composta (DIGGLE et al., 2002), o que permitiu tratar na análise estatística

situações em que mais de um dente foi reimplantado no mesmo paciente, levando em consideração a possibilidade de correlação entre eles. O modelo GEE foi introduzido pela primeira vez por LIANG e ZEGER (1986) e se tornou muito popular nas disciplinas biológicas, epidemiológicas e afins, sendo adotado como uma abordagem padrão para dados correlacionados, especialmente com desfechos categóricos. Esta abordagem é inédita na literatura sobre traumatismos dentários uma vez que até então este problema havia sido solucionado selecionando-se, ao acaso, apenas um dente por paciente (ANDREASEN et al., 1995a, 1995 b) ou escolhendo-se o dente com o pior prognóstico (BARRETT e KENNY, 1997b). A utilização do modelo GEE, torna-se particularmente útil, considerando-se que a maioria dos estudos clínicos em traumatismos dentários, realizados em um único serviço, apresentam uma grande dificuldade de reunir amostras com poder estatístico razoável. Sendo assim, este trabalho também trouxe uma nova e importante contribuição para análise de dados clínicos em traumatismos dentários ao propor uma abordagem que permite se avaliar mais de um dente no mesmo paciente.

No presente estudo utilizamos a atividade de reabsorção como indicador do prognóstico dos dentes reimplantados por se tratar da sequela mais frequente após o reimplante de dentes permanentes, com prevalência relatada entre 74 e 96%, e por representar a principal causa de perda de dentes reimplantados (ANDREASEN e ANDREASEN, 2007). A avaliação da atividade de reabsorção como medida do prognóstico de dentes reimplantados também vai de encontro ao postulado por Barrett e Kenny (1997a) que chamam a atenção para a variação e subjetividade dos critérios utilizados para avaliação do desempenho clínico de reimplantes dentários e para a necessidade urgente de se adotar parâmetros quantitativos objetivos que permitam a comparação dos resultados viabilizando, desta forma, uma futura meta-análise. Após um reimplante, a RREI representa um processo predominantemente catalítico, associado à presença de infecção oriunda do espaço do canal radicular, enquanto a RRES resulta da incorporação da estrutura radicular no processo de remodelação óssea, devido a uma união direta entre o osso alveolar e a superfície da raiz. Para estudo da atividade de reabsorção foram utilizados dois indicadores radiográficos: o tipo de reabsorção (RREI x RRES) - de acordo com o critério descrito por Andreasen et al. (1995b) e o índice radiográfico descrito por Andersson et al., (1989). Estes dois parâmetros foram avaliados na consulta de início do TER e anualmente nas consultas de acompanhamento do paciente. Embora atualmente existam outras tecnologias disponíveis para se mensurar a atividade de RRE, como por exemplo as tomografias computadorizadas de *cone beam* TCCB (NANCE et

al., 2000; ESTRELA et al., 2009), optamos no presente estudo por não descartar o número significativo de casos atendidos antes do advento das novas tecnologias de diagnóstico por imagem, uma vez que o período de abrangência do estudo foi de 1994 a 2010. Acrescente-se aqui que esta tecnologia só foi disponibilizada na cidade de Belo Horizonte, onde foi conduzido o estudo, a partir de 2006, mesmo assim apenas em serviços privados. Além disso, embora as TCCB tenham se mostrado mais eficazes do que radiografias periapicais para o diagnóstico da RREI elas não fornecem medidas precisas para a RRES (NANCE et al., 2000; ESTRELA et al., 2009). Em contrapartida, o índice radiográfico por nós adotado se mostrou altamente confiável para identificar estas reabsorções em estudos anteriores (ANDERSSON et al., 1989; ANDERSON e BODIN, 1990; BARRETT e KENNY, 1997b; EBELESEDER et al., 1998), representa uma medida quantitativa e reproduzível e foi recomendado como procedimento padrão para avaliação da atividade de reabsorção (BARRETT e KENNY, 1997 a).

O período mínimo de acompanhamento deste estudo foi de 1 ano com mediana de 3 anos. Este é um aspecto importante a ser considerado na avaliação radiográfica das reabsorções radiculares após reimplantes dentários uma vez que, em estágios iniciais, existem dificuldades técnicas de identificação das mesmas devido à sobreposição da imagem de estruturas dentárias ou ósseas sobre as cavidades de reabsorção, principalmente quando localizadas nas superfícies vestibular e lingual (ANDREASEN et al., 1987; CHAPNICK et al., 1989). Além disso, estudos clínicos tem demonstrado que as reabsorções radiculares são eventos tardios, que aumentam sua incidência no médio e longo prazo após o reimplante (ANDERSSON et al., 1989; ANDREASEN et al., 1995b; BOYD et al., 2000; SOARES et al., 2008). No presente estudo, além do período de acompanhamento suficientemente longo, as dificuldades técnicas para o diagnóstico radiográfico das reabsorções também foram minimizadas tomando-se radiografias em diferentes angulações, de acordo com os critérios sugeridos na literatura por Andreasen e Andreasen (1985).

A primeira etapa deste trabalho consistiu no estudo do efeito de fatores como idade no momento do trauma, período extra-alveolar e condições de armazenamento do dente avulsionado, duração do período de imobilização, momento de início do TER e uso de antibioticoterapia sistêmica, na atividade de reabsorção determinada na consulta de início do TER, e ao final do acompanhamento do paciente. Vários estudos clínicos e experimentais avaliaram o papel destes fatores na etiopatogenia das RRE pós-traumáticas (ANDREASEN, 1975; NASJLETI et al., 1982; ANDERSSON et al., 1985; HAMMARSTRÖM et al., 1986b;

ANDERSON et al.,1989; ANDREASEN et al., 1995a; ., 1995b; BARRETT e KENNY, 1997b; SAE-LIM et al., 1998a; 1998b; EBELESEDER et al.;1998, KINIRONS et al.,1999; KINIRONS et al., 2000; DONALDSON e KINIRONS, 2001; PETROVIC et al., 2010; RHOUMA et al., 2012). Entretanto, além de transversais, a maioria destes estudos avaliou a ocorrência de RRE ao final do período de acompanhamento ao passo que pouca atenção foi dada aos fatores que determinam a atividade de reabsorção no período inicial após o reimplante. No presente trabalho avaliamos não só a atividade final de RRE mas também os fatores determinantes da RREI, antes da intervenção endodôntica, trazendo uma importante contribuição ao demonstrar que os fatores que influenciaram a ocorrência e gravidade da RREI antes do TER foram diferentes daqueles que influenciaram na progressão da RRES observada no longo prazo.

Para o estudo do padrão de evolução das reabsorções radiculares no longo prazo foi realizada uma análise de sobrevivência utilizando-se o modelo de taxa de falhas proporcionais de Cox tendo como variável resposta o tempo decorrido a partir do reimplante, até se atingir índices de reabsorção superiores a 6 (falha). A matriz de variância-covariância robusta foi utilizada para corrigir os erros padrões dos estimadores do modelo devido a analisarmos mais de um dente reimplantado por paciente. A escolha do ponto de corte no índice 6, como evento da variável resposta, se justifica por representar a perda de 50% da estrutura radicular e considerando-se que quadros avançados de reabsorção debilitam a estrutura radicular podendo levar à esfoliação do dente ou a fraturas cervicais (CVEK, 1992). A análise de sobrevivência se presta muito bem para a avaliação do prognóstico no longo prazo, pois permite incorporar pacientes em diferentes momentos do acompanhamento o que a torna vantajosa para o estudo de reimplantes tendo em vista os longos períodos necessários para se atingir tamanhos de amostra razoáveis. Além disso, o conhecimento dos fatores que podem atuar na progressão das RRE, e conseqüentemente no tempo que este dente pode permanecer na boca, representa uma informação mais completa e tem um impacto direto no plano de tratamento da avulsão dentária a médio e longo prazo. O modelo de sobrevivência para análise do efeito de variáveis demográficas e clínicas no tempo de permanência de dentes reimplantados tem referência na literatura nos trabalhos de BARRETT E KENNY (1997b), POHL et al. (2005) e PETROVIC et al. (2010). Além disso, a análise de sobrevivência também foi utilizada para avaliar a ocorrência dos diferentes tipos de reabsorção no longo prazo (BOYD et al., 2000) e no período inicial após o reimplante (DONALDSON e KINIRONS, 2001). Destaque-se aqui que o presente estudo utilizou, de forma inédita, o modelo de Cox ajustado para incorporar o

efeito do tempo também nas covariáveis que modificaram sua condição ao longo do acompanhamento, a saber: realização do TER e presença da imobilização.

Nossos resultados demonstraram que, enquanto a RREI representou o tipo de reabsorção mais prevalente até o início do TER, a RRES foi predominante no longo prazo, corroborando dados da literatura (ANDERSSON et al., 1989; ANDREASEN et al., 1995b; DONALDSON e KINIRONS, 2001). Considerando esta distribuição nossos resultados sobre a atividade de reabsorção inicial se aplicam principalmente à subamostra constituída de 182 dentes portadores de RREI inicial. Da mesma forma as análises de sobrevida realizadas para os 135 casos que desenvolveram RRES no longo prazo apresentam maior poder estatístico.

No presente estudo, tanto a ocorrência quanto a extensão da RREI inicial foram progressivamente influenciados pelo momento da pulpectomia ou seja, cada dia decorrido entre o reimplante e o início do TER, representou um incremento de 1,2% na chance de desenvolver RREI. No estado atual do conhecimento, podemos afirmar que o efeito progressivo observado no presente estudo, não havia sido identificado anteriormente. Outra contribuição inédita dos nossos resultados foi a relação direta da pulpectomia tardia com a maior chance de desenvolver quadros de RREI com índices superiores a 4, considerados moderados e severos (0,5% ao dia). Diante destes resultados são coerentes com o papel central desempenhado pela infecção do canal radicular na etiopatogenia das RREI progressivas, demonstrado em estudos experimentais (ANDREASEN, 1981a; ANDREASEN, 1981b; TROPE et al., 1992). O papel da bactéria, bem como de seus subprodutos já é bem estabelecido na etiopatogenia das reabsorções ósseas periapicais de origem endodôntica (GRAVES et al., 2011). Como as bactérias presentes no SCR são inacessíveis à resposta imune, a menos que a infecção seja removida mecanicamente através do TER, uma resposta inflamatória persistente é mantida no LP e na superfície radicular danificados pelo trauma. Esta resposta do hospedeiro desempenha um papel protetor crítico na resistência à infecção, mas também tem consequências destrutivas que resultam na lesão tecidual (SIQUEIRA Jr., 2009). Curiosamente, o tempo decorrido entre o reimplante e o momento da pulpectomia não influenciou a taxa de progressão da RRE no longo prazo seja na amostra como um todo, seja quando considerados os casos de RRES separadamente. Este resultado reforça a premissa de que a etiopatogenia dos dois tipos de reabsorção avaliados no presente estudo, RREI e RRES, é diferente. Enquanto a remoção do fator infeccioso efetivamente controla os quadros de RREI, a evolução da RRES no longo prazo não sofreu influência direta da infecção endodôntica inicial.

Nossos resultados também demonstraram que a idade no momento do trauma representou um importante fator determinante da atividade de reabsorção tanto inicial quanto da progressão da RRE no longo prazo. Para esta análise utilizamos dois pontos de corte que haviam sido previamente associados na literatura com a atividade de REE. Observamos que o ponto de corte de 16 anos foi determinante da maior ocorrência de reabsorção inicial independentemente do tipo ou extensão. Além disso, a probabilidade de progressão rápida da RRE foi 68% menor em pacientes com idades superiores 16 anos no momento do trauma. Este efeito protetor da idade foi mais evidente na RRES uma vez que a probabilidade de progressão rápida da RRES foi 79% menor em pacientes com mais de 16 anos no momento do trauma. Estes resultados estão de acordo com os relatos de Andersson et al. (1989) ao observarem que pacientes com idades inferiores a 16 anos no momento do reimplante apresentaram evolução mais rápida da RRES. Além disso, embora não tão evidente como no ponto de corte de 16 anos, nossos resultados demonstraram que pacientes com idades superiores a 11 anos no momento do trauma também apresentaram menor probabilidade de desenvolver progressão rápida da RRES (48%). Considerando-se que a RRES é regulada pelos mesmos mecanismos moduladores da reabsorção do osso alveolar, pode-se especular que a maior atividade de RRES observada nos pacientes com idades inferiores a 16 anos se deve à maior taxa de remodelação óssea observada durante o pico de crescimento da adolescência (ANDERSSON et al., 1989). Observamos também que a idade de 11 anos foi um importante ponto de corte para atividade de RREI inicial uma vez que pacientes com idades superiores a 11 anos no momento do reimplante apresentaram 64% menos chance ($p=0,02$) de desenvolver quadros moderados e severos de RREI inicial (índices > 4). A característica da presente amostra, constituída exclusivamente por dentes com rizogênese completa e ápice fechado, sugere que a idade influencia a atividade de reabsorção através de outros mecanismos além do já conhecido efeito do grau de rizogênese. A maior extensão de RREI observada nos pacientes mais jovens do que 11 anos de idade pode ser atribuída ao fato de que, mesmo com a rizogênese completa, dentes jovens apresentam túbulos dentinários amplos o que permite que o trânsito livre e em maior quantidade de bactérias e seus subprodutos do ambiente do SCR para a superfície da raiz (ANDREASEN, 1981d; HAMMÄRSTROM et al., 1986a).

O período extra-alveolar do dente avulsionado, quando considerado o ponto de corte de 15 min, não foi determinante da atividade inicial de RRE. Para a atividade de reabsorção observada no longo prazo, embora se tenha observado uma tendência da taxa de progressão

rápida da RRE ser maior no grupo com período extra-alveolar superior a 15 min para a amostra como um todo ($p=0,08$), este efeito não pode ser comprovado quando analisados os casos de RRES separadamente ($p=0,31$). Este resultado contrasta com os resultados prévios da literatura que relacionaram a atividade inicial de RRE com a duração do período extra-alveolar superior a 20 min (KINIRONS et al.;1999), 30 min (BOYD et al., 2000) e 15 min (DONALDSON e KINIRONS, 2001). Além disso, também diferem dos resultados que demonstraram uma associação significativa entre a atividade de reabsorção no longo prazo e o período extra-alveolar (PETROVIC et al., 2010; ANDERSSON e BODIN, 1990; ANDREASEN et al., 1995b). As divergências encontradas entre os resultados atuais e os dados da literatura devem levar em consideração as características da amostra atual na qual 92,2% dos casos apresentaram período extra-alveolar superiores ao ponto de corte de 15 min. Quando considerados os casos mantidos a seco observa-se que somente 1 caso (1,2%) foi reimplantado dentro do período de 15 min. Esta concentração dos casos acima do período descrito na literatura como determinante da atividade de reabsorção pode ter impedido comparações mais consistentes.

Na presente amostra o meio de armazenamento do dente avulsionado apresentou-se significativamente associado com a progressão da reabsorção observada ao longo do segmento. O armazenamento do dente em meios úmidos, especialmente no leite representou um fator de proteção contra a progressão mais rápida da REE observada no longo prazo. Este efeito protetor também foi evidente quando considerada a subamostra constituída dos casos de RRES. Estes achados são coerentes com os mecanismos envolvidos na cicatrização do LP após um reimplante dentário (LEKIK e McCULLOCH, 1996). Sabe-se que a preservação de um pool de células viáveis, na porção do LP que fica aderida à superfície da raiz após uma avulsão é fundamental para que a cicatrização após um reimplante aconteça com neoformação de um ligamento periodontal normal e com mínima atividade de reabsorção (ANDREASEN, 1975; ANDREASEN, 1980a; ANDREASEN e KRISTERSON, 1981). Este reparo normal se dá às custas de células tronco precursoras dos fibroblastos que proliferam e recobrem a superfície da raiz (LEKIK e McMULLOCH, 1996). Outro grupo celular de grande importância neste processo são os restos epiteliais de Malassez que permanecem mergulhados no LP após a fragmentação da bainha epitelial radicular, organizados sob a forma de ilhotas ou cordões e formando uma rede que envolve toda a raiz, à semelhança de uma cesta de basquete. Embora o próprio nome induza à uma concepção errada de que estes remanescentes são “restos” sem função ou quando muito envolvidos em mecanismos patológicos como a

formação de cistos perirradiculares, sabe-se hoje em dia que estas células não são quiescentes e desempenham, entre outras funções, um importante papel na manutenção do espaço do LP impedindo desta forma a anquilose alvéolo-dentária e a RRES (KEINAN e COHEN, 2013). Entretanto, a viabilidade destes grupos celulares após uma avulsão depende de um curto período extra-alveolar, que não ultrapasse 15 min a seco (LEKIK et al., 1996; LEKIK et al., 1998), ou da manutenção do dente em meios de armazenamento que reponham os metabolitos e mantenham a vitalidade destas células (UDOYE et al., 2012). Entre a miríade de substâncias propostas para o armazenamento de dentes avulsionados, existem evidências experimentais, desde os estudos clássicos de BLOMLÖF et al. (1983) que o leite é um meio compatível com a manutenção da viabilidade e capacidade clonogênica das células do LP desde que os dentes sejam armazenados dentro de um período de 15 a 20 min (UDOYE et al., 2012). Além disso, nossos resultados corroboram os dados dos poucos estudos clínicos disponíveis que demonstraram o melhor prognóstico de dentes armazenados em meios como o soro, a água e a saliva (MACKIE e WORTHINGTON, 1992; ANDREASEN et al., 1995b; DONALDSON e KINIROS, 2001; WERDER et al., 2011). Os resultados relativos ao desempenho clínico do armazenamento de dentes avulsionados no leite se revestem de especial interesse por serem inéditos. Muito embora exista uma extensa literatura de estudos experimentais que comprovam os benefícios do leite como meio de armazenamento (UDOYE et al., 2012), os dados clínicos até então disponíveis consistiam de dados descritivos, com um número muito reduzido de casos e portanto, sem validade estatística. A primeira referência clínica sobre o leite como meio de armazenamento foi apresentada por Mackie e Worthington (1992) que observaram menor ocorrência de RRE num grupo de 17 dentes armazenados no leite, soro ou saliva (análise univariada, qui-quadrado). Entretanto, o estudo não apresenta informações específicas sobre o armazenamento no leite e não foi realizada uma análise multivariada para avaliação conjunta com outras variáveis clínicas. Donaldson e Kinirons (2001) avaliaram o efeito do meio de armazenamento no início da atividade de reabsorção após o implante dentário. Utilizando curvas de sobrevida e o teste de Log-Rank os autores demonstraram que dentes armazenados a seco apresentaram maior risco de reabsorções precoces quando comparados com dentes armazenados em meios úmidos (41 dentes no leite, 9 dentes na saliva, 6 dentes na água, 2 dentes no soro). Os autores entretanto não apresentam os resultados específicos para cada meio e nem entre os meios úmidos entre si. Além disso também não foi realizada uma análise conjunta considerando os outros fatores determinantes. No estudo de Petrovic et al. (2010), o meio de armazenamento não exerceu nenhum efeito significativo na ocorrência de RRE após o implante. Entretanto, embora os autores tenham

realizado uma análise multivariada utilizando-se do modelo de Cox, o tamanho reduzido da amostra, 32 dentes, sendo que 26 permaneceram a seco durante o período extra-alveolar, pode ter enfraquecido o poder estatístico do trabalho. Por fim, Werder et al. (2011), também observaram que o armazenamento do dente avulsionado em meio de cultura apresentou os melhores índices de cicatrização do LP, seguido pelo armazenamento no leite ou no soro. O pequeno número de casos (42 dentes), entretanto, inviabilizou uma análise estatística.

Causa estranheza o fato do efeito protetor dos meios de armazenamento não ter sido observado na atividade inicial de RREI medida na consulta de início do TER contrariando o que foi observado no longo prazo para os casos de RRES, e diferindo também de outros estudos que demonstraram o efeito das condições de armazenamento do dente avulsionado na ocorrência de RRE logo após o replante (KINIRONS et al., 1999; BOYD et al., 2000; DONALDSON e KINIRONS, 2001). Uma provável explicação para os nossos resultados pode ser a distribuição desfavorável em relação ao momento da pulpectomia, ou seja, na grande maioria da presente amostra o início do TER foi tardio (mediana de 2,2 meses após o replante) quando comparada com o período ideal de 14 dias recomendado pelos protocolos atuais. A principal consequência desta demora no início do TER é a exposição prolongada do PL danificado à infecção presente no SCR uma vez que a microbiota envolvida na infecção do SCR pode aumentar em quantidade e variedade de espécies com o tempo de infecção, estando, por exemplo, diretamente associada ao tamanho das lesões periapicais (ROÇAS e SIQUEIRA, 2008). A exposição prolongada do LP danificado às bactérias e seus subprodutos pode ter se sobreposto aos efeitos de um armazenamento favorável uma vez que a presença da infecção pode retardar ou mesmo impedir a cicatrização (GRAVES et al., 2011). Curiosamente, a perda deste efeito protetor não foi permanente tendo se manifestado no longo prazo diminuindo a probabilidade de progressão rápida da RRES. Este fato pode ser interpretado à luz dos conhecimentos disponíveis sobre o papel da bainha epitelial na cicatrização de transplantes, autotransplantes ou periodontites apicais em dentes permanentes jovens necrosados. Estudos experimentais em macacos demonstraram que mesmo pequenas frações remanescentes da bainha epitelial são suficientes para induzir a continuidade de formação radicular em dentes transplantados e autotransplantados (ANDREASEN et al., 1988). Além disso, existem evidências clínicas (TORNECK, 1982) e experimentais (DAS et al., 1997) de que as células da bainha radicular, da papila dental apical e do folículo dentário podem sobreviver na presença da infecção retomando suas atividades metabólicas após a eliminação da contaminação bacteriana através do TER. Estas células então seriam

responsáveis pelos mecanismos de reparo observados após a apexificação (RAFTER, 2005), revascularização de dentes traumatizados (CVEK et al., 1992; KVINNSLAND e HEYERAAS, 1990; RUNGVECHVUTTIVITTAYA et al., 1998; YANPSET e TROPE, 2000) ou cicatrização pulpar de dentes permanentes jovens necrosados submetidos às terapias regenerativas (THIBODEAU et al. 2007;). O mesmo comportamento pode ser esperado dos restos epiteliais de Malassez, uma vez que também se originam da bainha epitelial e participam ativamente no processo de cicatrização do LP (WESSELINK et al., 1993; HASEGAWA et al., 2003), e das células tronco envolvidas no processo de reparo do LP (AMAR, 1996; McCULLOCH, 2000). Sendo assim, pode-se conjecturar que, o armazenamento em meio favorável permite a manutenção da vitalidade dos remanescentes epiteliais de Malassez e de outras células tronco do LP que passam por um período de inatividade e quiescência enquanto houver a presença de infecção no SCR. Após a desinfecção do SCR através do TER, estas células entram novamente em atividade estimulando os mecanismos de reparo das estruturas que protegem a superfície da raiz a saber: camada cementoblástica e LP, explicando desta forma o efeito protetor do meio de armazenamento observado no longo prazo.

Nossos resultados demonstraram que o período de imobilização não exerceu influência na atividade de RREI inicial, observada antes do TER, mas foi diretamente proporcional à taxa de progressão rápida da RRES no longo prazo. A função da imobilização é manter em posição e estabilizar um dente reimplantado durante o período inicial de cicatrização das fibras do LP (OIKARINEN, 1990). Entretanto, estudos experimentais demonstraram que, embora a imobilização semi-rígida ajude na cicatrização normal do LP, períodos prolongados da mesma podem aumentar a incidência de RRES (ANDREASEN, 1975; ANDERSSON et al., 1985). Os estudos clínicos nesta área são inconclusivos. Se por um lado os resultados de Kinirons et al. (1999) confirmaram uma maior frequência de RRES após períodos prolongados de imobilização, não existem evidências que comprovem que períodos curtos de imobilização estão associados com melhores índices de cicatrização periodontal ou menor incidência de RRES (HINCKFUSS e MESSER 2009b). Nossos resultados portanto, trazem uma contribuição importante ao confirmar a hipótese de que períodos prolongados de imobilização favorecem a ocorrência de RRES no longo prazo.

No presente estudo o uso de antibioticoterapia sistêmica não influenciou a ocorrência ou gravidade da RREI, observada antes do TER, ou da RRES, observada no longo prazo. Embora a vantagem da antibioticoterapia sistêmica tenha sido demonstrada experimentalmente

(HAMMARSTRÖM et al., 1986; SAE-LIM et al., 1998) este efeito não pode ser comprovado nos levantamentos clínicos disponíveis (ANDREASEN e HJØRTING-HANSEN, 1966a; ANDREASEN et al., 1995b; BARRETT e KENNY, 1997b). Mais recentemente, a meta-análise realizada por Hinckfuss e Messer (2009c) concluiu que os benefícios do emprego da antibioticoterapia sistêmica foram inconclusivos. Estes achados são consistentes com o fato de que a infecção no interior do canal radicular, responsável em última instância, pela ativação e manutenção da RREI não é atingida pelos antibióticos administrados pela via oral pois já não existem vasos viáveis no tecido pulpar necrótico. Os resultados atuais, considerados em conjunto com os dados da literatura, assumem uma grande relevância uma vez que esta conduta é recomendada na maioria dos protocolos atuais com o objetivo de reduzir o risco de RREI, particularmente nos casos de TER tardio (ANDERSSON et al., 2012; Protocolo da Associação Americana de Odontopediatria, 2007; Protocolo do Ministério da Saúde da Malásia, 2002; GREG e BOYD, 1998). Considerando o risco de efeitos colaterais, o sério problema da resistência bacteriana, e a falta de evidências que sustentem os benefícios do uso de antibioticoterapia sistêmica após o reimplante dental, esta recomendação foi questionada em recente editorial do periódico *Dental Traumatology* (SHAH e ASHLEY, 2010).

Os resultados obtidos relativos à participação da idade no momento do trauma, momento do TER, meio de armazenamento e duração da imobilização na atividade de reabsorção após os reimplantes dentários demonstraram que estes fatores tem uma importante participação na etiopatogenia das RRE e que, se controlados, podem melhorar o prognóstico final dos reimplantes. Entretanto, não são capazes de explicar completamente as diferenças interindividuais observadas. A ocorrência de RRES antes da realização do TER, de altos índices de reabsorções em curto período de tempo decorrido após o reimplante ou ainda, mínima atividade de reabsorção mesmo após TER tardios, são achados clínicos intrigantes que suscitam importantes questionamentos: diferenças na resposta individual poderiam estar envolvidos na determinação de diferentes padrões de cicatrização após o trauma e frente à infecção?... Em que pese a pertinência e relevância desta pergunta, existem ainda preocupantes lacunas na literatura odontológica relacionadas à microbiota endodôntica em dentes traumatizados. Diferenças no tipo e carga das espécies bacterianas dominantes, bem como suas interações resultantes, podem ser responsáveis por diferentes graus de patogenicidade e, conseqüentemente, da gravidade da resposta do hospedeiro (SIQUEIRA et al., 2004) e foram relacionadas, com o tamanho (FIGDOR e SUNDQVIST, 2007; ROÇAS e

SIQUEIRA, 2008) e diferentes formas clínicas das alterações periapicais (ROÇAS e SIQUEIRA, 2008). Considerando-se estes resultados e evidências experimentais de que dentes com cavidades abertas apresentaram menos RREI do que dentes cuja cavidade pulpar se manteve fechada (HAMMARSTRÖM et al., 1986) é razoável supor que as diferenças observadas na ocorrência e intensidade da RREI também podem estar relacionadas com a comunidade bacteriana presente no SCR de dentes traumatizados. Sabendo-se que a microbiota do canal radicular pode variar em função do tempo de infecção (SIQUEIRA e ROCAS, 2009), da exposição do SCR ao meio oral ou não (BRUNO et al., 2009; SASSONE et al., 2012), e da origem geográfica da amostra (SIQUEIRA e ROCAS, 2009), seria desejável uma caracterização mais específica da microbiota endodôntica após reimplantes dentários, principalmente considerando-se a permanência do dente avulsionado em ambiente extra-alveolar. Entretanto, informações específicas sobre a microbiologia de dentes traumatizados são raras, advindo em grande parte ainda dos estudos clássicos realizados por Berghenholtz (1974) e Sundqvist (1976), e demandam pesquisas adicionais.

Além da constituição da microbiota endodôntica, outra questão relevante é relativa à via de infecção de dentes reimplantados. Atualmente duas hipóteses tem sido sugeridas para explicar o desenvolvimento de infecções endodônticas em dentes traumatizados hígidos: a via anacorética proposta por Grossman (1967) na qual o tecido pulpar isquêmico ou necrosado em decorrência da ruptura do feixe vaso-nervoso apical, atrai microrganismos presentes na circulação durante uma bacteremia transitória. Entretanto, este mecanismo ainda permanece controverso diante dos resultados conflitantes encontrados em estudos experimentais (DELIVANIS et al., 1981, MÖLLER et al., 1981) e da falta de evidências que a comprovem como fonte de infecção na situação clínica. Outra hipótese para explicar a infecção endodôntica em dentes traumatizados sem exposição pulpar seria a presença de trincas no esmalte as quais, mesmo imperceptíveis clinicamente, permitem o acesso de bactérias aos túbulos dentinários. Na ausência do fluido dentinário, os túbulos representam uma via de acesso direto até o tecido pulpar necrosado não oferecendo resistência à invasão bacteriana que se dá por meio de proliferação celular (LOVE, 1996; 2002; 2004). Estudos futuros sobre este tema, portanto, serão fundamentais para o entendimento da patogênese da RREI.

A imprevisibilidade do prognóstico dos reimplantes, ainda que realizados de acordo com os protocolos existentes, obrigatoriamente conduz à questão do papel da resposta imune na cicatrização pulpar e periodontal após traumatismos dentários. Enquanto esse tema vem sendo amplamente estudado em relação à instalação e evolução de outras doenças orais tais

como a doença periodontal e as periodontites apicais (GRAVES et al., 2011), resultados de um único estudo publicados recentemente (ROSKAMP et al., 2009; ROSKAMP et al., 2011) demonstraram uma associação entre o perfil imunológico predominantemente Th2, representado por pacientes atópicos, e o melhor prognóstico dos reimplantes (avaliado de acordo com a presença/ausência de reabsorções), independentemente do manejo e tratamento inicial dos dentes avulsionados. Considerando-se a importância das citocinas na biologia dos tecidos ósseos e nos processos de reabsorção patológica dos tecidos mineralizados, variações na sua expressão podem determinar diferentes respostas inflamatórias dos indivíduos frente a um estímulo padrão. Nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado que polimorfismos em genes que codificam para as citocinas podem influenciar na suscetibilidade a desordens da cavidade oral como por exemplo a doença periodontal (DUTRA et al., 2009) e reabsorções pos-ortodônticas (WU et al, 2013; HARTSFIELD, 2009). No presente trabalho avaliamos de forma inédita, o papel de polimorfismos em genes que codificam para citocinas, seus receptores e para as MMPs, na atividade de RRE em dentes reimplantados. 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 identificar fatores de susceptibilidade envolvidos no desenvolvimento de formas graves destes quadros, assim como fatores prognósticos da evolução clínica.

De um modo geral os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que polimorfismos nos genes que codificam para a Il-1RA, Il-1 α , Il-10 e OPG apresentaram associação com a atividade de reabsorção sugerindo que o perfil genético do paciente pode contribuir na maior susceptibilidade à RRE após o reimplante de dentes permanentes. Algumas questões metodológicas de cunho mais geral merecem uma consideração antes de se discutir a relação específica entre os SNPs avaliados e os indicadores da atividade de reabsorção. A primeira questão é relativa ao reconhecido efeito da etnia nos estudos de polimorfismos. Sabe-se que diferenças étnicas podem influenciar na frequência dos polimorfismos estudados, na possibilidade de desequilíbrio de ligação com outras variantes genéticas de interesse bem como em outros fatores ambientais que podem atuar na expressão gênica (LITTLE et al., 2002). Entretanto, este fator não foi considerado na presente amostra uma vez que classificar brasileiros com base em características fenotípicas é um pobre indicador de ancestralidade genética. A introdução de marcadores genéticos de etnicidade seria uma alternativa para se determinar a herança das principais populações fundadoras da população brasileira. Mesmo assim, os acentuados níveis de miscigenação principalmente no

estado de Minas Gerais, onde o estudo foi realizado, muitas vezes inviabilizam o agrupamento de amostras brasileiras em grupos étnicos definidos (PARRA et al., 2003). Assim, estudos genéticos mais aprofundados, utilizando-se marcadores étnicos bem definidos seriam necessários para se avaliar a influência desta variável na frequência dos polimorfismos. Outra questão que merece consideração é a avaliação da violação do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) na amostra estudada. O postulado de HW demonstra que frequências genotípicas em um locus genético são estáveis nas sucessivas gerações desde que os acasalamentos ocorram ao acaso e não existam pressões evolutivas ou fluxo de genes (WITTIKE-THOMPSON et al., 2005). O equilíbrio de HW tornou-se amplamente aceito como um modelo subjacente em genética de populações sendo que desvios podem sinalizar problemas importantes tais como viés na seleção da amostra ou erros de genotipagem podendo, desta forma comprometer as inferências de estudos de associação genéticos (TRIKALINOS et al., 2006). Entretanto este tema é controverso uma vez que raramente uma população vai estar em perfeito equilíbrio de HW exceto em condições de isolamento; ausência de migração ou pressões evolutivas (SHOEMAKER et al., 1998). Enquanto a necessidade do EHW no grupo controle, livre da doença sob investigação ou na população em geral parece ser um requisito básico para validar resultados que demonstrem uma associação positiva, desvios da lei de HW no grupo de doentes são inerentes, principalmente em amostras pequenas e seriam passíveis de ser ajustados através de métodos estatísticos adequados (WITTIKE-THOMPSON et al., 2005; ZOU e DONNER, 2006). No presente estudo a distribuição genotípica para os SNPs rs 1800896, no gene que codifica para a IL-10, rs 8086340 no gene que codifica para a RANK, rs 2277438 no gene que codifica para a RANKL, e rs 243865 no gene que codifica para a MMP2 não se encontrava em equilíbrio de HW. Entre estes, somente o SNP rs 1800896 apresentou associação com os índices de RREI inicial. Considerando-se que o este SNP está bem estabelecido na população brasileira, de acordo com estudos prévios realizados em outras áreas, e que o modelo estatístico utilizado, regressão logística no GEE, atende aos critérios estabelecidos na literatura para estudos de associação diante de desvios do EHW (ZOU e DONNER, 2006) , acreditamos que os resultados obtidos no presente estudo são válidos embora estudos adicionais com amostras maiores sejam necessários para confirma-los.

No presente estudo, os SNPs estudados no gene *IL1A* rs 1800587, e *IL1RN* rs 419598 apresentaram uma associação significativa com a progressão da RRE no longo prazo, mesmo após a análise conjunta com outros fatores sabidamente de risco, como o meio de

armazenamento, o tempo de imobilização e a idade. Nossos resultados demonstraram que pacientes homozigotos para o alelo T no SNP *IL1A* rs 1800587 apresentaram uma taxa de progressão rápida da RRE duas vezes maior quando comparados com os outros genótipos quando analisada a amostra como um todo. Quando avaliados os casos de RRES separadamente este efeito se tornou ainda mais evidente uma vez que os homozigotos para o alelo polimórfico T apresentaram uma taxa de progressão rápida da RRES 2,5 vezes maior quando comparados com os outros genótipos. Embora comparações diretas não possam ser feitas, um paralelo interessante pode ser traçado com os resultados obtidos por Gül den et al. (2009) que relataram que pacientes portadores do genótipo TT neste SNP apresentaram maior risco e maior extensão de RREA após o tratamento ortodôntico. Esta correlação entretanto não pode ser comprovada em outros estudos envolvendo outras populações de origem caucasiana (IGLESIAS-LINARES et al., 2012b; LINHARTOVA et al., 2013). A maior velocidade de RRES observada na presente amostra é coerente com estudos que demonstraram que este SNP está em desequilíbrio de ligação com outro SNP (rs 17561), que por sua vez determina uma maior eficiência na clivagem do precursor inativo da IL-1 α facilitando sua expressão pela célula (KAWAGUCHI et al., 2007). Além disso, para o SNP rs 419598 no gene *IL1RN* observa-se que a taxa de progressão da RRE nos pacientes homozigotos para o alelo polimórfico C foi 1/3 daquela observada nos pacientes homozigotos para o alelo T. O efeito protetor do alelo C neste SNP é compatível com o fato deste SNP estar em desequilíbrio de ligação com outro polimorfismo de variação do número de repetições in tandem (VNTR) no intron 2, cuja variante com 2 alelos está associada a um aumento na produção da proteína (CLAY et al., 1996; DANIS, 1995; HURME e SANTILLA, 1998). Como a IL-1RA se liga ao receptor da IL-1 (IL-1RI), sem causar qualquer efeito biológico direto, atua inibindo competitivamente as respostas mediadas pela IL-1 α e IL-1 β , o aumento dos níveis plasmáticos desta citocina tem uma ação anti-inflamatória e antirreabsortiva. O efeito deste SNP também foi demonstrado em dentes, vitais ou tratados endodonticamente, portadores de RREA pós-ortodôntica (IGLESIAS-LINARES et al., 2012b; IGLESIAS-LINARES et al., 2013; LINHARTOVA et al., 2013). Curiosamente, nenhuma associação foi demonstrada entre o SNP *IL1B* rs 1143634e a atividade de REE no longo prazo. Além disso nenhum dos três SNPs nos genes que codificam para a família da IL-1 avaliados no presente estudo influenciaram a atividade de RREI inicial avaliada na consulta de início do TER. A princípio este resultado soa estranho tendo em vista o importante papel desempenhado por estas citocinas, especialmente a IL-1 β , na mobilização dos mecanismos de defesa do hospedeiro frente a desafios bacterianos (GRAVES et al., 2011). Morsani et al. (2011) observaram uma

associação significativa entre a presença do alelo C e periodontite apical persistente após o TER em uma amostra norte-americana. Por outro lado, Siqueira et al. (2009) também relataram uma ausência de associação entre os SNPs nos genes que codificam para IL-1 α e IL-1 β e o processo de cicatrização da periodontite apical em uma amostra de brasileiros. A falta de correlação também foi relatada em relação ao desenvolvimento de formas aguda e supurativa periodontite apical em dois estudos realizados com sul-americanos (de SA et al., 2007; AMAYA et al., 2013). Uma explicação possível para a ausência de correlação entre os polimorfismos estudados nos genes que codificam para a família da IL-1 e a atividade de RREI observada na presente amostra, é o fato do início do TER ter sido tardio na grande maioria dos casos, resultando na exposição prolongada da superfície da raiz e do LP danificado à bactérias oriundas do SCR. Sabe-se que lipopolissacarídeos da parede bacteriana estimulam a produção de IL-1 ampliando a resposta inflamatória e criando ciclos de regulação positiva que podem perpetuar mecanismos destrutivos do processo inflamatório (GRAVES et al., 2011). Outra perspectiva interessante surge de estudos *in vivo* e *in vitro*, realizados em outras áreas, que têm sugerido que o polimorfismo *IL1RN* rs 419598 poderia ser o regulador chave no equilíbrio dos níveis de expressão da IL-1 β e IL-1RA (HURME e SANTTILA, 1998; CLAY et al., 1996; DANIS, 1995). Esta hipótese ganha força quando considerados os estudos que realizaram a análise de haplótipos na família da IL-1 cujos resultados apontam para uma associação consistente do SNP rs 419598 no gene *IL1RN* e a atividade de RREA pós-ortodôntica, seja em dentes vitais seja em dentes tratados endodonticamente (IGLESIAS-LINARES et al., 2012b; IGLESIAS-LINARES et al., 2013, LINHARTOVA et al., 2013) que nem sempre foi observada em relação aos SNP rs 1143634 no gene *IL1B* (LINHARTOVA et al., 2013) ou com o SNP rs 1800587 no gene *IL1A* (IGLESIAS-LINARES et al., 2013, LINHARTOVA et al., 2013).

Os resultados atuais também demonstraram uma associação entre variações genéticas no gene que codifica para a IL-10 e a susceptibilidade à RREI uma vez que indivíduos portadores do alelo G+ (AG+GG) no SNP *IL10* rs 1800896 apresentaram menor chance desenvolver quadros mais graves de RREI quando comparados com indivíduos sem o alelo G (genótipo AA). Estes resultados são consistentes com estudos anteriores que relataram uma associação entre a presença do alelo G (GG+GA) e uma menor chance de desenvolver artrite reumatóide (ZHANG et al., 2011). Por sua vez, genótipos portadores do alelo A (GA, AA), apresentaram um risco aumentado de ter periodontite crônica (JARADAT et al., 2012) e de degeneração do disco lombar (LIN et al., 2011). Estes resultados são coerentes com o papel altamente regulador do processo inflamatório atribuído à IL-10, cujos efeitos benéficos foram

descritos na limitação da resposta imune excessiva e na destruição tecidual (SABAT et al., 2010). O efeito protetor da IL-10 observado em lesões osteolíticas pode ser atribuído à sua capacidade de suprimir a secreção de citocinas pró - inflamatórias, como a IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α (SABAT et al., 2010) e de inibir a osteoclastogênese (MENEZES et al., 2008; LORENZO et al., 2008). O papel protetor da IL-10 foi demonstrado nas lesões periapicais de origem endodôntica e na doença periodontal (MENEZES et al., 2008). Além disso IL-10 também apresentou um efeito inibidor sobre a osteoclastogênese durante a reabsorção radicular na dentição primária (LIU et al., 2006). Considerando o papel das bactérias na etiologia da RREI, o papel central da IL-10 no controle da resposta Th1 e que a presença do alelo G foi associada a níveis elevados de IL-10 (TURNER et al., 1997; LARSSON et al., 2011), pode -se supor que o efeito protetor observado no presente amostra foi devido aos altos níveis de IL-10 nos portadores dos genótipos G+. No entanto, estudos funcionais devem ser realizados para confirmar esta hipótese. Curiosamente, este efeito do polimorfismo IL-10 só pôde ser evidenciado em combinação com fatores de risco primários tais como a idade e o momento da pulpectomia. Este fato reforça a natureza multifatorial da RREI sendo que, ao nível individual, a expressão da doença é resultado da interação entre a suscetibilidade genética e a exposição a diferentes fatores de risco ambientais e clínicos ao posto que o efeito de um único gene .

Tendo em vista o papel central que as citocinas do eixo RANK-RANKL-OPG desempenham no controle da atividade de reabsorção dos tecidos mineralizados, também nos propusemos a pesquisar se polimorfismos nos genes que codificam para estas citocinas poderiam estar associados com a atividade de REE após reimplantes dentários. Nossos resultados demonstraram que os pacientes portadores do alelo C (GC+CC) no SNP rs 8086340 no gene *TNFSRF11A* (RANK) e homozigotos para o alelo G (GG) no SNP rs 2277438 no gene *TNFS11* (RANKL) apresentaram prioritariamente baixos índices de RREI inicial. Entretanto, as associações nominais observadas para estes SNPs perderam a significância após o ajuste para covariáveis como idade e momento da pulpectomia no modelo de regressão logística multivariada. Estes resultados são coerentes com resultados prévios que não observaram diferenças significativas na prevalência dos genótipos do SNP rs 2277438 no gene *TNFS11* (RANKL) em outras condições inflamatórias infecciosas como a periodontite (SOEDARSONO et al., 2006; KADKHODAZADEH et al., 2013) e peri-implantite (KADKHODAZADEH et al., 2013).

Os resultados obtidos para o SNP rs 2073618 no gene *TNFSRF11B* (*OPG*) demonstram que pacientes portadores da variante alélica C (CG+CC) apresentaram 3,6 vezes mais chance de desenvolver RREI inicial. Curiosamente nenhuma associação foi observada quando comparados os grupos com baixos e altos índices de RREI. Da mesma forma nenhuma associação foi observada com a atividade de RRES no longo prazo. Estes resultados são coerentes com aqueles de Hartsfield (2009) que observaram uma maior chance de desenvolver RREA pos-ortodôntica em pacientes portadores do genótipo CC neste SNP. Este polimorfismo também foi associado à uma maior predisposição a desenvolver necrose mandibular induzida pelo uso de bifosfonados (KATZ et al., 2011) e perimplantite (KADKHODAZADEH et al., 2012). Os resultados dos estudos de associação entre este SNP e a doença periodontal são controversos uma vez que nenhuma associação pôde ser comprovada entre este SNP e a periodontite crônica (WAGNER et al., 2007; PARK et al., 2008) e entre este SNP e a periodontite aguda no estudo realizado por Soedarsono et al. (2006) em uma amostra japonesa. Já Park et al. (2008) relataram uma associação significativa entre o alelo G e a doença periodontal agressiva em uma amostra chinesa. Uma recente meta-análise também revelou que o alelo G neste SNP está associado com a perda da densidade mineral óssea e aumento da susceptibilidade para a osteoporose (LEE et al., 2010). Este SNP rs 2073618 situa-se no locus +1181 no exon 1, consistindo troca de uma base G para C levando à mudança de um aminoácido de característica básica, a lisina (AAG), para um aminoácido polar não carregado, a aspargina (AAC) no peptídeo sinal da proteína OPG, o que influenciando o tráfego da mesma (WYNNE et al., 2002). Entretanto, não existe consenso quanto ao efeito deste SNP nos níveis séricos da proteína. Enquanto ZHAO et al. (2005) relataram níveis séricos de OPG mais baixos em mulheres portadoras do genótipo CC, MENCEJ-BEDRAC et al. (2011) observaram níveis séricos de OPG aumentados em portadoras do genótipo CC. Outros autores não observaram correlação entre os níveis séricos de OPG e os genótipos deste SNP (UELAND et al., 2007; KIM et al., 2007). Além disso, as comparações entre os resultados atuais e os estudos acima mencionados devem levar em conta que, o alelo polimórfico C foi o mais prevalente na nossa amostra (77%), sendo que os pacientes homocigotos para este alelo representaram 44,8% da nossa amostra. Esse polimorfismo mostra uma variação significativa na frequência relatada em amostras de diferentes origens, sendo que a homocigose para o alelo C foi mais rara entre indivíduos iranianos, 5,3%, (KADKHODAZADEH et al., 2012) e mais frequente entre indivíduos dinamarqueses, 31,4% (LANGDAHL et al., 2002) e britânicos, 30,3% (DAROSZEWSKA et al., 2004). Entretanto, grandes variações foram observadas em amostras de mesma etnia,

como por exemplo a asiática (OHMORI et al., 2002; ZHAO et al., 2005; SOEDARSONO et al., 2006; PARK et al., 2008). Uma explicação para a grande frequência deste alelo na nossa amostra seria o alto grau de miscigenação observada na população brasileira, especialmente no estado de Minas Gerais onde o estudo foi desenvolvido (PARRA et al., 2003). Entretanto, não existem dados sobre este polimorfismo em outra amostra brasileira, o que impede comparações diretas relativas à distribuição genotípica deste SNP. Este fato evidencia mais um ponto de contribuição original deste trabalho.

Os polimorfismos estudados no gene que codifica para MMP2 não apresentaram associação com nenhum dos indicadores da atividade de reabsorção estudados seja na consulta inicial seja no longo prazo. A análise dos genótipos do rs 2285053 foram realizadas somente para os genótipos agrupados de acordo com a presença do alelo polimórfico T uma vez que na presente amostra somente 1 paciente apresentou o genótipo homozigoto para o alelo polimórfico inviabilizando uma avaliação mais consistente do efeito de cada genótipo separadamente. Este padrão de distribuição também foi observado em outros levantamentos (VASKU et al., 2002; YU et al., 2004; MISHRA et al., 2012; GUSMÃO, 2012). A distribuição de frequência do polimorfismo rs 3918242 no gene que codifica para a MMP9 também foi impeditiva para se realizar os estudos de associação uma vez que não foram observados pacientes homozigotos para o alelo C e 97,9% dos pacientes eram heterozigotos. Embora outros estudos realizados com amostras brasileiras tenham observado frequências relativamente baixas do genótipo homozigoto para o alelo polimórfico T, a ausência de indivíduos CC, também relatada por GUSMÃO et al. (2012), causa estranhamento uma vez que em outras amostras brasileiras os indivíduos CC foram maioria (BELO et al., 2004; PLANELLO et al., 2011; ANDRADE et al., 2012).

Em síntese, embora exista uma vasta gama de estudos que avaliaram o papel de SNPs em genes que codificam para citocinas e outros fatores locais, nos processos patológicos osteolíticos na cavidade oral tais como a doença periodontal e as reabsorções pós-ortodônticas, nossos resultados relativos à associação entre SNPs e REEs pos-traumáticas são pioneiros e sugerem que variações genéticas podem explicar ao menos parcialmente, as diferenças na evolução da REE após o replante de dentes permanentes. Em que pese o fato da amostra atual ter apresentado uma distribuição desfavorável dos parâmetros clínicos relacionados ao manejo e tratamento do dente avulsionado, a estratégia estatística adotada permitiu avaliar a força de associação entre os fatores avaliados e a atividade de reabsorção mesmo quando testadas conjuntamente. Algumas hipóteses instigantes foram levantadas e

abrem importantes perspectivas para estudos futuros, com amostras maiores e que permitam a estratificação em relação aos fatores de risco clínicos.

Considerando-se a importância de fatores locais na modulação da atividade de reabsorção fisiológica e patológica dos tecidos mineralizados e a escassez de informações específicas sobre o perfil imunoinflamatório das RRE pós-traumáticas também nos propusemos neste trabalho, a avaliar a expressão de citocinas, quimiocinas e MMPs, no tecido perirradicular de dentes reimplantados, portadores de diferentes padrões de reabsorção radicular, com indicação de extração. Na maioria dos casos o motivo da extração foi a presença de quadros avançados de RRE (54,0%), seguida da indicação ortodôntica (27,0%) e das fraturas cervicais (19,0%). Estes números são coerentes com os dados da literatura que apontam as RRE como principal causa da perda dentes reimplantados (ANDREASEN e ANDREASEN, 1992) e com os resultados de CVEK (1992) que demonstraram o maior risco de fraturas cervicais nos defeitos deixados pela RRE na superfície radicular. De acordo com o critério radiográfico adotado, 22 dentes foram classificados como portadores de RREI (Fig.4). 24 dentes, foram classificados como portadores de RRES (Fig.5) e 17 dentes foram classificados como reabsorções mistas (Fig.6). Quadros de reabsorções mistas podem representar uma fase intermediária de cicatrização quando o próprio processo inflamatório envolvido na RREI destrói extensas áreas do LP. Nesta situação o reparo acontece às custas de células progenitoras derivadas do osso alveolar dando origem a um quadro de RRES (LINDSKOG et al., 1985; HAMMARSTRÖM et al.,1989; McCULLOCH et al., 1987). O mecanismo inverso também é válido ou seja, quadros avançados de REES podem se reverter em quadros inflamatórios de RREI quando o processo de substituição expõe microrganismos residuais que não foram totalmente eliminados durante o TER e ficam abrigados em áreas da dentina tais como as ramificações do SCR, túbulos dentinários e inclusões vasculares. Outro mecanismo para evolução das reabsorções mistas acontece quando quadros extensos de RRES atingem a região cervical e são contaminados por bactérias presentes no sulco gengival que por sua vez, induzem o aparecimento da RREI (ANDREASEN e ANDREASEN, 2007).

Nossos resultados demonstraram que, de um modo geral, os níveis dos fatores locais avaliados apresentaram diferenças significativas quando comparados dentes portadores de RRE, independentemente do tipo, com o grupo controle, livre de reabsorção. A concentração de IL-1RA, de IL- 6, IL- 8, IFN γ , TNF α , TGF β , CCL5, RANK e OPG apresentou-se elevada nos três grupos amostrais. A primeira inferência que se pode fazer destes resultados é que, independentemente do tipo de reabsorção, fatores, que comprovadamente atuam nos processos fisiológicos e patológicos de reabsorção óssea também atuam regulando a atividade

de reabsorção radicular pós-trauma seja ela induzida pela resposta à infecção ou não (LORENZO et al, 2008). O fato de citocinas pro-inflamatórias como a IL-6, TNF α , IFN γ , citocinas antirreabsortivas como a IL-1RA, OPG, TGF β e quimiocinas como a IL-8 e a CCL5 apresentarem-se elevadas em praticamente todos os tipos de reabsorção chama a atenção e a princípio poderia ser interpretado como contraditório à hipótese inicial deste trabalho, de que RREI e RRES apresentam perfil imunoinflamatório distintos. Entretanto, estes resultados devem ser analisados com cautela considerando-se que os mediadores que participam das interações celulares necessárias para formação e ativação da célula clástica são basicamente os mesmos, tanto em condições fisiológicas quanto durante processos patológicos (LORENZO et al., 2008). Além disso, deve-se ter em mente que a dinâmica dos processos reabsortivos não é contínua e envolve fases de intensa atividade catalítica, nas quais há um predomínio de fatores ativadores da osteoclasia, seguida de fases de síntese, sendo que o predomínio de uma fase sobre a outra determina o avanço da atividade de reabsorção. Tecendo um paralelo com a dinâmica das lesões periapicais, sabe-se que várias populações celulares distintas atuam em diferentes momentos exercendo papéis contrários na patogênese das lesões periapicais. Assim é que, em modelos experimentais em animais, a produção de citocinas Th1 predomina no estágio inicial de expansão da lesão e a produção de citocinas Th2 é induzida em estágios mais tardios uma vez que agem na fase de estabilização de lesões crônicas (KAWASHIMA e STASHENKO., 1999). Este padrão cíclico com surtos de atividade catalítica alternados com fases proliferativas e de cicatrização também foi observado durante a rizólise de dentes decíduos (HAROKOPAKIS-HAJISHENGALLIS, 2007), na doença periodontal (COCHRAN, 2008) e durante a movimentação ortodôntica (WISE e KING, 2008). No presente estudo não foi possível estabelecer um padrão cronológico para cada grupo representativo dos diferentes tipos de reabsorção, ou seja, cada grupo amostral foi constituído por dentes com diferentes tempo de reabsorção, ainda que na sua maioria os dentes apresentavam altos índices de reabsorção. Outra limitação metodológica do presente estudo foi a falta de correção do peso da amostra após o descarte da parte mineralizada da raiz durante o processamento das amostras para o ELISA. Como a diluição foi calculada para o peso total da raiz este fato pode ter introduzido uma distorção na diluição das amostras. Sendo assim, os níveis das citocinas, observados no presente estudo, se prestam mais como um indicador da presença da doença do que propriamente para uma caracterização da dinâmica dos diferentes tipos de reabsorção. A mesma ressalva deve ser feita quando analisada a ausência de diferenças significativas nos níveis de Il-10, Il-17A, CCL2 e CCL3, quando comparados os grupos amostrais, portadores dos 3 tipos de reabsorção e o grupo controle, ou

quando analisados os níveis significativamente menores de IL-4 verificados nos 3 grupos amostrais em relação ao grupo controle.

A comparação dos três grupos amostrais entre si demonstrou que dentes portadores de RREI apresentaram níveis significativamente maiores de IL-1 β e TNF α , principalmente em relação ao grupo com RRES. Estes resultados são coerentes com estudos experimentais prévios que demonstraram que a administração de receptores solúveis para IL-1 e para TNF α , reduziu a quantidade de reabsorção radicular induzida por trauma mecânico em molares de ratos (ZHANG et al., 2003). Estudos *in vivo* também demonstraram a expressão de TNF α nas lacunas de reabsorção após reimplantes de molares de ratos (REGO et al., 2011). Outra etapa deste mesmo estudo, realizada *in vitro*, demonstrou que células da linhagem osteoblástica e cementoblástica tratadas com LPS aumentaram a expressão de *mRNA* TNF α o que resultou na maior expressão de *mRNA* RANKL (REGO et al., 2011). A participação da IL-1 e TNF α também foi demonstrada na rizólise de dentes decíduos (WISE e KING, 2008) e níveis aumentados destas citocinas foram observados no fluido e no tecido gengival durante a movimentação ortodôntica (GRIEVE et al, 1994; UEMATSU et al., 1996; IWASAKI et al., 2001). O fato dos níveis de IL-1 α e TNF α , no presente estudo, estarem aumentados na RREI é coerente com seu quadro histopatológico descrito por ANDREASEN (1981b) – numerosas lacunas de Howship preenchidas por OCLs na superfície radicular e presença de infiltrado inflamatório com linfócitos, plasmócitos e PMNs no LP vizinho, e pode ser explicada fazendo-se um paralelo com resultados que demonstraram o papel central das citocinas IL-1 e TNF α na reabsorção óssea das lesões periapicais de origem endodôntica (ARTESE et al., 1991; BARKHORDAR et al., 1999; WANG et al., 1993). A rápida destruição óssea observada na lesões periapicais de origem endodôntica, principalmente nos estágios iniciais da lesão resulta principalmente da atuação de bactérias e seus subprodutos, especialmente o LPS da parede celular de anaeróbios Gram-negativos, ativando receptores tipo Toll (TLRs) expressos por células presentes nas lesões endodônticas - monócitos/macrófagos, granulócitos, fibroblastos, pré-osteoclastos, e células mesenquimais (BAR-SHAVIT, 2008) que por sua vez passam a expressar citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1, TNF α e IL-6, (FOUAD, 1997; TANI-ISHII et al., 1995). Considerando-se a participação bacteriana na etiopatogenia das RREI pode-se inferir que os mesmos mecanismos imunopatológicos estão envolvidos.

Na presente amostra os níveis de IL-6, outra citocina considerada pró-inflamatória mostraram-se elevado em todos os grupos amostrais em relação ao grupo controle e sugerem

que esta citocina pode estar envolvida na modulação da RRE. Níveis aumentados desta citocina no fluido do sulco gengival de pacientes portadores de RREA (KUNNI et al., 2013) e no exudatos de lesões periapicais humanas (TAKEICHI et al., 1996) foram associados com uma ação estimuladora de reabsorção nestes contextos. Nossos resultados entretanto, não nos dão subsídios para concluir qual o mecanismo específico de atuação da IL-6 nas diferentes formas de RRE. Pode-se conjecturar que estes achados se devem ao fato destas citocinas serem produzidas tanto por células do infiltrado inflamatório (COLIC et al., 2009), quanto por células do estroma ósseo (Van BEZOOIJEN et al., 1998), quando estimuladas por citocinas como a IL-1 e TNF α , que também estavam aumentadas em todos os grupos amostrais.

Os níveis de IFN γ também se apresentaram aumentados nos 3 grupos amostrais em relação ao grupo controle livre de reabsorção. Embora não existam referências na literatura relativas ao papel do IFN γ nas reabsorções radiculares, estudos experimentais demonstraram que estas citocinas estão envolvidas na patogênese da reabsorção óssea periapical (COLIC et al., 2009), desempenhando um provável papel protetor (De ROSSI et al., 2008). Considerando-se que a principal fonte celular de IFN γ são linfócitos T ativados, seus níveis elevados na RREI e reabsorções mistas são compatíveis com o quadro histopatológico descrito para este tipo de reabsorção.

No presente levantamento não pudemos observar diferenças significativas nos níveis de IL-17, nem entre os grupos experimentais entre si, nem quando comparados com os controles livres de reabsorção. A ausência de IL-17a nos dentes avaliados no presente estudo entretanto deve ser avaliada à luz das limitações metodológicas descritas anteriormente. Considerando-se que a participação da IL-17 na RREA pos-ortodôntica foi demonstrada em estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* (HAYASHI et al., 2012) e foi implicada na patogênese das lesões periapicais (COLIC et al., 2009), estudos adicionais são necessários para se avaliar o papel desta citocina na RREI e na RRES em dentes reimplantados.

Os resultados relativos aos níveis de citocinas tradicionalmente reguladoras da atividade de reabsorção demonstraram que, enquanto os níveis de TGF β foram significativamente maiores nos três grupos amostrais quando comparados com o grupo controle, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de IL-10 e de IL-4. Embora não existam dados específicos sobre o papel destes mediadores no controle de reabsorções dentárias, o fato da IL-4 praticamente não ter sido identificada nas nossas

amostras pode ser interpretado à luz de resultados anteriores que demonstraram que seu papel no controle das lesões periapicais é secundário (SASAKI et al., 2000; De ROSSI et al., 2008). Os resultados obtidos para o TGF β também são coerentes com seu papel regulador descrito nas lesões periapicais nas quais ha um predomínio de linfócitos B (COLIC et al., 2009). Os resultados pertinentes à IL-10 causam surpresa uma vez que seu papel protetor no controle das reabsorções ósseas periapicais é bem estabelecido (SASAKI et al., 2000; De ROSSI et al., 2008; COLIC et al., 2009). Mais uma vez as limitações relativas às variações no tempo de evolução do processo de reabsorção da presente amostra podem ter influenciado nos resultados observados, principalmente para a IL-10.

Os níveis de IL-1RA na presente amostra foram significativamente maiores nos dentes portadores de reabsorção quando comparados com os controles livres de reabsorção. Embora a IL-1RA nao atue diretamente na atividade clástica sua atuação inibitória das respostas mediadas pela IL-1 α e IL-1 β acaba por conferir-lhe um papel antirreabsortivo. Concentrações elevadas de IL-1RA foram observadas no fluido crevicular gengival de pacientes com doença periodontal, (BOSTROM et al., 2000). Além disso, IL-1RA nao foi detectada no fluido crevicular de pacientes saudáveis (KABASHIMA et al., 1991; ISHIHARA et al., 1997). Estudos experimentais também demonstraram que a administração de IL-1RA diminuiu a expressão de IL-1 β e TNF α e aumentou a expressão de IL-10 no ligamento periodontal de dentes de camundongos, diminuindo desta forma a quantidade da movimentação ortodôntica (SALLA et al., 2012). Considerando-se que a IL-1RA é produzida pelos mesmos tipos celulares que produzem as formas agonistas da IL-1, e que o equilíbrio na expressão de IL-1 e IL-1RA pode ser crucial para o desenvolvimento de lesões periapicais (SHIMAUCHI et al., 1998), estudos futuros são necessários para se avaliar a proporção IL-1 β /IL-1RA nos diferentes tipos de REE e em diferentes momentos da evolução das REE.

A expressão das citocinas RANK e OPG na presente amostra foi significativamente maior nos dentes portadores de reabsorção quando comparados com o grupo controle sem reabsorção. Estes resultados são coerentes com o papel central que as citocinas do eixo RANK-RANKL-OPG desempenham no processo de reabsorção. Os níveis aumentados de RANK em dentes portadores de reabsorção é coerente com o aumento de células clásticas e suas precursoras encontradas em locais de reabsorção e suas imediações. A expressão aumentada de RANK por odontoclastos multinucleados e por seus precursores mononucleados foi demonstrada durante a rizólise de dentes decíduos localizados nas lacunas de reabsorção e adjacências (LOSSDÖRFER et al., 2002). Alterações no padrão de

distribuição e níveis de expressão de RANK também foram descritas após a aplicação de forças ortodônticas excessivas sobre o LP (SHIOTANI et al., 2001). O aumento dos níveis de OPG observados nos dentes portadores de reabsorção em relação aos controles saudáveis representa um achado esperado e reflete o aumento na síntese desta proteína devido à presença de estímulos resultantes do próprio processo de reabsorção. Entretanto, as extrapolações a partir dos nossos resultados ficam limitadas uma vez que os níveis de RANKL não foram avaliados. Sabe-se que o desequilíbrio na proporção RANKL/OPG é o responsável pela maior ou menor atividade catalítica durante o processo de reabsorção dos tecidos mineralizados. Um desequilíbrio em favor de uma maior produção de RANKL foi demonstrada no LP de dentes decíduos durante a rizólise (TYROVOLA et al., 2008), no LP de dentes portadores de RREA pós-ortodôntica (YAMAGUCHI, 2009; NAKANO et al., 2010) e durante a fase de expansão das lesões periapicais (KAWASHIMA et al., 2007; SABETI et al., 2005; ZHANG e PENG, 2005). Estudos futuros são necessários para se verificar um possível desequilíbrio na expressão de RANKL/OPG nas diferentes formas de RRE, bem como o papel de outros mediadores importantes, na expressão das citocinas do eixo RANK-RANKL-OPG durante a RRE.

Quimiocinas desempenham um importante papel durante o recrutamento, diferenciação e fusão das células clásticas além de atuarem alterando a função e propriedades dos OCLs maduros, o que lhes confere um status de moduladoras do processo de reabsorção (SILVA et al., 2007). Sendo assim, também nos propusemos a avaliar a concentração das quimiocinas CCL2, CCL3, CCL5 e IL-8 (CXCL8). Nossos resultados demonstraram que os níveis de IL-8 foram significativamente maiores em todos os grupos amostrais, quando comparados com o grupo controle, e se mostraram particularmente maiores nas reabsorções mistas quando comparadas com a RREI e RRES. O aumento da IL-8 observado em todos os grupos pode ser explicado pelo papel direto que esta quimiocina desempenha na osteoclastogênese através da ligação com receptores expressos pelos precursores dos OCLs (BENDRE et al., 2003). Além disso estudos experimentais demonstraram que OCLs podem expressar IL-8 sugerindo um mecanismo de amplificação autocrina durante a osteoclastogênese que pode contribuir para a reabsorção (ROTHER et al., 1998). Em um processo inflamatório, IL-8 é um importante fator quimiotático para neutrófilos que desempenham um papel primordial na defesa contra microrganismos. Embora o papel dos neutrófilos nas reabsorções dentárias ainda não seja bem definido, estas células foram identificadas durante as fases agudas da rizólise (SASAKI et al., 1990). Além disso, estudos

experimentais demonstraram que componentes não colagênicos da dentina podem atuar induzindo a migração de neutrófilos através de um mecanismo que envolve a produção de IL-1, TNF α e das próprias quimiocinas (SILVA et al., 2004). A participação de IL-8 também foi demonstrada na reabsorção radicular provocada pela movimentação ortodôntica (ARSANO et al., 2011) e nas lesões periapicais crônicas (MARTON et al., 2000).

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de CCL2 e CCL3 quando comparados os grupos amostrais entre si nem com o grupo controle. Diferenças significativas nos níveis de CCL5 (RANTES – quimiotática para linfócitos T e outros leucócitos) só foram observadas entre o grupo controle, sem reabsorção, e as reabsorções mistas e por substituição, mas não diferiram entre a RREI e o grupo controle e nem entre os grupos amostrais. Os níveis aumentados de CCL5 observados nas reabsorções mistas é compatível com seu papel quimiotático para linfócitos uma vez que estas reabsorções representam fases intermediárias do processo de cicatrização das reabsorções inflamatórias ou resultam de quadros substitutivos extensos que, ao se depararem com áreas infectadas, são estimulados a aumentar a atividade osteolítica em resposta à agressão bacteriana. Coerentemente, esta quimiocina desempenha um importante papel nas lesões periapicais crônicas (MARTON et al., 2000). Os níveis aumentados de CCL5 observados na RRES também chamam a atenção e podem ser explicados pelo fato dos próprios osteoclastos serem capazes de produzir esta quimiocina em um mecanismo de amplificação autocrina da própria atividade clástica (KIM et al., 2006). Curiosamente, os níveis de CCL2 e CCL3 não se mostraram alterados nos dentes com reabsorção tão pouco foram observadas diferenças significativas nos níveis de CCL5 na RREI. A princípio inusitados, estes resultados podem ser atribuídos à limitações metodológicas relacionadas à seleção da amostra. Sabendo-se que a secreção de citocinas e quimiocinas é um evento breve, autolimitado, e altamente regulado por mecanismos autócrinos e parácrinos, a grande variação do padrão cronológico da atividade de reabsorção da presente amostra pode ter influenciado nesta avaliação.

O presente trabalho traz também o estudo da expressão de proteases extracelulares, a MMP2 e MMP9, em dentes portadores de reabsorções radiculares externas. Estas moléculas são constitutivamente expressas nos tecidos periodontais e osso alveolar saudáveis e estão envolvidas no processo de remodelação fisiológica da matriz extracelular (DELAISSÉ et al., 2000). Além disso, também são expressas por células inflamatórias e um aumento na sua produção tem sido relacionado com a destruição tecidual observada em várias condições, patológicas ou não, que envolvem aumento da atividade osteolítica como por exemplo a

doença periodontal (BIRKEDAL-HANSEN, 1993), lesões periapicais (HANNAS et al., 2007), rizólise dos dentes decíduos (WISE E KING., 2008) e remodelação dos tecidos de sustentação durante a movimentação ortodôntica (KERRIGAN et al., 2000). Nossos resultados revelaram que os níveis de MMP2 foram significativamente maiores nos dentes portadores de RRES quando comparados com o grupo controle, e com os outros grupos amostrais portadores de RREI e reabsorções mistas. Estes resultados são coerentes com o mecanismo histopatológico descrito para a RRES que consiste na substituição gradual da estrutura radicular por tecido ósseo em decorrência da incorporação da estrutura radicular no processo de remodelação fisiológica do osso alveolar, uma vez que as estruturas que normalmente protegem a raiz, LP e camada cementoblástica, foram perdidas (ANDREASEN, 1981c; HAMMARSTRÖM et al., 1989). Uma primeira explicação para este resultado é o papel protagonista que estas proteinases desempenham na degradação da matriz colagênica durante os processos de reabsorção óssea (DELAISSÉ et al., 2003). Entretanto, a MMP2 também possui outras formas mais sutis de atuação. Sabe-se que estas enzimas atuam estimulando fatores de crescimento, especialmente o TGF β , fazendo uma ligação entre a atividade reabsortiva e proliferativa durante o processo de remodelação óssea (JENKINS, 2008), e no recrutamento e migração de células tronco durante o processo de reparo (LAPIDOT et al., 2005). O fato destes dois processos estarem aumentados na RRES também podem ter contribuído para os níveis elevados de MMP2 observados neste grupo amostral (HAMMARSTRÖM et al., 1989).

Menos óbvios são os resultados obtidos em relação à expressão de MMP9 uma vez que seus níveis foram relativamente baixos em todos os grupos amostrais praticamente não diferindo do grupo controle sem reabsorção. MMP9 é uma protease secretada prioritariamente pelos OCLs (OKADA et al., 1995), possuindo um importante papel durante as fases iniciais de recrutamento e migração dos pré-OCLs (WRIGHT et al., 2005). Além disso atua na digestão da camada osteóide, o que expõe a fase mineralizada do tecido ósseo atraindo os pré-OCLs que interagem com a matriz mineralizada, completam sua diferenciação e se tornam ativas (PIERCE, 1989). Sendo assim, uma explicação para os baixos níveis observados na presente amostra o poderiam ser atribuídos às variações no estágio de reabsorção entre os casos avaliados no presente estudo.

Em síntese, nossos resultados demonstraram que, a despeito das limitações metodológicas descritas anteriormente, quando comparados os três grupos amostrais entre si, dentes portadores de RREI apresentaram níveis significativamente maiores de IL-1 β e TNF α ,

principalmente em relação à RRES, sugerindo que estas citocinas, potentes estimuladoras da reabsorção óssea, também desempenham um importante papel na modulação da RREI. Além disso, dentes portadores de RRES apresentaram níveis de MMP2 significativamente mais altos quando comparados aos outros tipos de reabsorção. Considerando-se a escassez de informações específicas sobre o perfil imunoinflamatório dos diferentes padrões de reabsorção radicular, RRES e RREI, observadas após os reimplantes dentários, os resultados atuais trazem uma contribuição inédita para a literatura odontológica e, em que pese limitações inerentes a estudos clínicos longitudinais envolvendo pacientes, a dificuldade de se reunir amostras padronizadas e representativas de uma patologia relativamente rara como as reabsorções radiculares, nossos resultados tem o grande mérito de serem pioneiros e de fornecerem parâmetros básicos e critérios metodológicos para estudos futuros.

7- CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no estudo do efeito da idade e genótipo do paciente bem como fatores relacionados ao manejo e tratamento do dente avulsionado, na atividade de reabsorção após o reimplante de dentes permanentes nos permitiram concluir que:

- ✓ - A idade no momento do trauma representou um fator determinante da atividade de reabsorção após o reimplante seja no período inicial, isto é, antes do início do tratamento endodôntico radical, seja no logo prazo. Pacientes com idade inferior a 16 anos tiveram maior chance de desenvolver RREI antes do TER e de progressão mais rápida da RRES no longo prazo. Pacientes com idade inferior a 11 anos no momento do trauma tiveram maior chance de apresentar quadros mais graves de RREI antes do TER.
- ✓ Cada dia transcorrido entre o momento do reimplante e o início do TER aumentou a chance de ocorrência de quadros mais graves de RREI mas não afetou a atividade de RRES no longo prazo.
- ✓ Períodos de imobilização prolongados determinaram progressão mais rápida das RRES no longo prazo mas não afetaram a ocorrência de RREI inicial.
- ✓ O armazenamento do dente avulsionado em meios úmidos, especialmente o leite representou um fator de proteção para a RRES no longo prazo estando associado a uma taxa de evolução mais lenta da RRES.
- ✓ O uso de antibioticoterapia sistêmica no momento do reimplante não exerceu nenhum efeito seja na atividade de RREI inicial, antes do início do TER, seja na progressão de RRES no longo prazo.
- ✓ A presença do alelo polimórfico T do SNP rs 1800896 no gene que codifica para a IL-10 apresentou uma associação com a menor gravidade dos quadros de RREI observada antes do TER.
- ✓ A presença do alelo polimórfico C no SNP rs 2073618 no gene que codifica para a OPG apresentou associação com uma maior chance de desenvolver RREI antes do TER..
- ✓ O SNP rs 1800587 no gene que codifica para a IL-1 α , e o SNP rs 419598, no gene que codifica para a IL-1RA apresentaram associação com a taxa de progressão da RRE no longo prazo.

Os resultados obtidos no estudo da expressão de citocinas, quimiocinas e MMPs no tecido perirradicular de dentes reimplantados portadores de RRE nos permitiram concluir que:

- ✓ IL-1 β e TNF- α , potentes estimuladores das reabsorções ósseas patológicas, apresentaram níveis elevados na RREI sugerindo que estes fatores também participam na sua modulação.
- ✓ O altos níveis de MMP2 observados na RRES representam um indício de que este processo é modulado pelos mesmos fatores que atuam na remodelação do osso alveolar
- ✓ Importantes fatores locais envolvidos na atividade de reabsorção óssea tais como IL-1RA, IL-6, IL-8, IFN γ , TNF α , TGF β , CCL5, RANK e OPG, apresentaram-se com níveis aumentados nos dentes portadores de RREI, RRES e reabsorções mistas sugerindo a sua participação na modulação das RRE pós-traumáticas.

Considerados em conjunto nossos resultados sugerem diferentes padrões de expressão de citocinas como IL-1 β e TNF- α e da MMP2 na RREI e RRES e que polimorfismos funcionais em genes que codificam para citocinas, em associação com fatores de risco clínicos, podem estar associados a fatores de susceptibilidade determinantes da ocorrência e progressão das RRE pós-traumáticas.

8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS

- AL-QAWASMI, R. et al. Genetic predisposition to external apical root resorption in orthodontic patients: linkage of chromosome-18 marker. **Journal of Dental Research**, v.82, n.5, p. 356-360, May 2003a.
- AL-QAWASMI, R. et al. Genetic predisposition to external apical root resorption. **American Journal Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v.123, n.3, p. 242-252, Mar. 2003b.
- AMAR,S. Implications of cellular and molecular biology advances in periodontal regeneration. **TheAnatomical Record**,v.245, n.2, p. 361-373, June 1996.
- AMAYA, M.P. et al. Polymorphisms of pro-inflammatory cytokine genes and the risk for acute suppurative or chronic nonsuppurative apical periodontitis in a Colombian population. **International Endodontic Journal**, v.46, n.1, p. 71-78, Jan. 2013.
- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY. Decision trees for management of an avulsed permanent tooth. 2014 Disponível em URL: http://www.aapd.org/media/Policies_Guidelines/RS_TraumaFlowSheet.pdf pdf. Acesso em: 21/06/ 2014.
- ANDERSSON, L. et al. Effect of masticatory stimulation on dentoalveolar ankylosis after experimental tooth replantation. **Endodontics Dental Traumatology**, v.1, n.1, p. 13-16, Feb. 1985.
- ANDERSSON, L. et al. International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2. Avulsion of permanent teeth. **Dental Traumatology**, v.28, n.2, p. 88-96, Apr. 2012.
- ANDERSSON, L.; BODIN, I. Avulsed human teeth replanted within 15 minutes - a long term clinical follow-up study. **Endodontics Dental Traumatology**, v.6, n.1, p. 37-42, Feb. 1990.
- ANDERSSON, L.; BODIN, I.; SÖRENSEN, S. Progression of root resorption following replantation of human teeth after extended extra-oral storage. **Endodontics Dental Traumatology**, v.5, n.1, p. 38-47, Feb. 1989.
- ANDRADE, V.L. et al. Functional polymorphism located in MMP-9 gene promoter is strongly associated with obesity. **DNA Cell Biology**, v.31, n.6, p. 1054-1057, June 2012.
- ANDREASEN, F.M. et al. Radiographic assessment of simulated root resorption cavities. **Endodontics Dental Traumatology**, v.3, n.1, p. 21-27, Feb. 1987.
- ANDREASEN, F.M.; ANDREASEN, J.O. Diagnosis of luxation injuries. The importance of standardized clinical, radiographic and photographic techniques in clinical investigation. **Endodontics Dental Traumatology**, v.1, n.5, p. 160-169, Oct. 1985.
- ANDREASEN, J.O. Analysis of pathogenesis and topography of replacement root resorption (ankylosis) after replantation of mature permanent incisors in monkeys. **Swedish Dental Journal**, v.4, n.6, p. 231-240, 1980a.
- ANDREASEN, J.O. Analysis of topography of surface and inflammatory root resorption after replantation of mature permanent incisors in monkeys. **Swedish Dental Journal**, v.4, n.4, p. 135-144, 1980b.
- ANDREASEN, J.O. Effect of extra-alveolar period and storage media upon periodontal and pulpal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. **International Journal of Oral Surgery**, v.10, n.1, p. 43-53, Feb. 1981a.
- ANDREASEN, J.O. et al. Dental Trauma Guide: A source of evidence-based treatment guidelines for dental trauma. **Dental Traumatology**,v.28, p. 142-147, 2012.
- ANDREASEN, J.O. et al. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 1- Diagnosis

- of healing complications. **Endodontics Dental Traumatology**, v.11, n.2, p. 51-58, Apr. 1995a.
- ANDREASEN, J.O. et al. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 4. Factors related to periodontal ligament healing. **Endodontics Dental Traumatology**, v.11, n.2, p. 76-89, Apr. 1995b.
- ANDREASEN, J.O. External root resorption: its implication in dental traumatology, paedodontics, periodontics, orthodontics and endodontics. **International Endodontics Journal**, v.18, n.2, p. 109-118, Apr. 1985.
- ANDREASEN, J.O. Interrelation between alveolar bone and periodontal ligament repair after replantation of mature permanent incisors in monkeys. **Journal of Periodontal Research**, v.16, n.2, p. 228-235, Mar. 1981b.
- ANDREASEN, J.O. Periodontal and pulpal healing of monkey incisors preserved in tissue culture before replantation. **International Journal Oral Surgery**, v.7, n.2, p.104-12. Apr, 1978.
- ANDREASEN, J.O. Periodontal healing after replantation and auto transplantation of incisors in monkeys. **International Journal Oral Surgery**, v.10, n.1, p. 54-61, Feb. 1981c.
- 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, July 1981d.
- ANDREASEN, J.O. The effect of pulp extirpation or root canal treatment of periodontal healing after replantation of permanent incisors in monkeys. **Journal of Endodontics**, v.7, n.6, p. 245-252, June 1981e.
- ANDREASEN, J.O. The effect of splinting upon periodontal healing after replantation of permanent incisors in monkeys. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.33, p. 313-323, 1975.
- ANDREASEN, J.O.; ANDREASEN, F.M. Avulsions. In: ANDREASEN, J.O.; ANDREASEN, F.M. **Text Book and color atlas of traumatic injuries to the teeth**. 3. ed. Copenhagen: Munksgaard, 1994. p. 383-420.
- ANDREASEN, J.O.; ANDREASEN, F.M. Avulsions. In: ANDREASEN, J.O.; ANDREASEN, F.M.; ANDERSSON, L. **Textbook and color atlas of traumatic injuries to teeth**. 4. ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. p. 444-488.
- ANDREASEN, J.O.; ANDREASEN, F.M. Root resorption following traumatic dental injuries. **Proceedings of the Finnish Dental Society**, v.88, n. Suppl 1, p. 95-114, 1992.
- 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, Nov. 1966b.
- 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, Nov. 1966a.
- ANDREASEN, J.O.; KRISTERSON, L.; ANDREASEN, F.M. Damage of the Hertwig's epithelial root sheath: effect upon root growth after autotransplantation of teeth in monkeys. **Endodontics and Dental Traumatology**, v.4, .4, p.145-51. Aug, 1988.
- ANDREASEN, J.O.; KRISTERSON, L. The effect of limited drying or removal of the periodontal ligament on periodontal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.39, n.1, p. 1-13, 1981.
- ARTESE, L. et al. Immunoreactivity for interleukin 1 β and tumor necrosis factor- α and ultrastructural features of monocytes/macrophages in periapical granulomas. **Journal of Endodontics**, v.17, n.2, p. 483-487, 1991.

- ASANO, M. et al. IL-8 and MCP-1 induced by excessive orthodontic force mediates odontoclastogenesis in periodontal tissues. **Oral Diseases**, v.17, n.5, p. 489-498, July 2011.
- ASSMANN, G. et al. Genetic variations in genes encoding RANK, RANKL, and OPG in rheumatoid arthritis: a case-control study. **The Journal of Rheumatology**, v.37, n.5, p. 900-904, May 2010.
- BARKHORDAR, R.A.; HAYASHI, C.; HUSSAIN, M.Z. Detection of interleukin-6 in human dental pulp and periapical lesions. **Endodontic Dental Traumatology**, v.15, n.1, p.26-27, Feb. 1999.
- BARRETT, E.J., KENNY, D.J. Survival of avulsed permanent maxillary incisors in children following delayed replantation. **Endodontics Dental Traumatology**, v.13, n.6, p. 269-275, Dec. 1997b.
- BARRETT, E.J.; KENNY, D.J. Avulsed permanent teeth: a review of the literature and treatment guidelines. **Endodontics Dental Traumatology**, v.13, n.4, p. 153-163, Aug. 1997a.
- BARRETT, J.C. et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v.21, n.2, p. 263-265, 2005.
- BAR-SHAVIT, Z. Taking a toll on the bones: regulation of bone metabolism by innate immune regulators. **Autoimmunity**, v.41, n.3, p. 195-203, Apr. 2008.
- BASTOS LAGES, E.M. et al. Association of functional gene polymorphism IL-1beta in patients with external apical root resorption. **American Journal Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v.136, n.4, p. 542-546, Oct. 2009.
- BASTOS, J.V. 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, Mar. 2014.
- BECKS, H.; MARSHALL, J. Resorption or absorption? **Journal of the American Dental Association**, v.19, p.1528-37, 1932.
- BEEGLY-FADIEL, A. Matrix metalloproteinase-2 polymorphisms and breast cancer susceptibility. **Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention**, v.18, n.6, p.1770-6. Jun, 2009.
- BELO, V.A. et al. Matrix metalloproteinase-9 genetic variations affect MMP-9 levels in obese children. **International Journal of Obesity**, v.36, n.1, p. 69-75, Jan. 2012.
- BENDRE, M.S. et al. Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease. **Bone**, v.33, n.1, p. 28-37, July, 2003.
- BERGENHOLTZ, G. Micro-organisms from necrotic pulp of traumatized teeth. **Odontol Revy**, v.25, p. 347-358, 1974.
- BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. **Journal Periodontal Research**, v.28, n.6 Pt 2, p. 500-510, Nov. 1993.
- BLANKENBERG, S. et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. **Circulation**, v.107, n.12, p. 1579-1585, Apr. 2003.
- BLOMLÖF, L. et al. Storage of experimentally avulsed teeth in milk prior to replantation. **Journal of Dental Research**, v.62, n.8, p. 912-916, Aug. 1983.
- BLOMLÖF, L.; LENGHEDEN, A.; LINDSKOG, S. Endodontic infection and calcium hydroxide-treatment. Effects on periodontal healing in mature and immature replanted monkey teeth. **Journal Clinical Periodontology**, v.19, n.9 Pt 1, p. 652-658, Oct. 1992.
- BLOMLÖF, L.; LINDSKOG, S.; HAMMARSTRÖM, L. Periodontal healing of ex articulated monkey teeth stored in milk or saliva. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v.89, n.3, p. 251-259, June 1981.

- BOOM, R. et al. Rapid and simple method for 538 purification nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.3, p. 495-503, Mar. 1990.
- BOSTRÖM, L.; LINDER, L.E.; BERGSTRÖM, J. Smoking and GCF levels of IL-1beta and IL-1ra in periodontal disease. **Journal Clinical Periodontology**, v.27, n.4, p. 250-255, Apr. 2000.
- BOUMAH, C.E.;SELVAMURUGAN, N.;PARTRIDGE, N.C. Transcription in the osteoblast: regulatory mechanisms utilized by parathyroid hormone and transforming growth factor-beta. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**,v.80, p. 287-321, 2005.
- BOYCE, B.F.; XING, L.The RANKL/RANK/OPG pathway. **Current Osteoporosis Report**, v.5, n.3, p. 98-104, Sept. 2007.
- BOYCE, B.F.Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions. **Journal Dental Research**, Oct;92(10):860-7 2013.
- BOYD, D.H.; KINIRONS, M.J.; GREGG, T.A. A prospective study of factors affecting survival of replanted permanent incisors in children. **International Journal Pediatric Dentistry**, v.10, n.3, p. 200-205, Sept. 2000.
- BOYLE, W.J.; SIMONET, W.S.; LACEY, D.L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, v.432, p.337-342, May 2003
- BRUNO, K.F. et al. Microbiological and microscopic analysis of the pulp of non-vital traumatized teeth with intact crowns. **Journalof Applied Oral Science**,v.17, n.5, p. 508-514, Sept./Oct. 2009.
- BURGER, E.H.; VAN DER MEER, J.W.; NIJWEIDE, P.J.Osteoclast formation from mononuclear phagocytes: role of bone-forming cells. **The Journal of Cell Biology**,v. 99, n.6, p. 1901-1906, Dec. 1984.
- CHAPNICK, L. External root resorption: an experimental radiographic evaluation. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v.67, n.5, p.578-82 May, 1989.
- CHAPPUIS, V.; Von ARX, T. Replantation of 45 avulsed permanent teeth: a 1-year follow-up study. **Dental Traumatology**, v.21, n.5, p. 289-296, Oct. 2005.
- CHENU, C. et al. Transforming growth factor beta inhibits formation of osteoclast-like cells in long-termhuman marrow cultures. **Procedies Natational Academy Sciences**,v.85, n.15, p. 5683-5687, Aug. 1988.
- CHOI, S.J. et al. Macrophage inflammatory protein 1-alpha is a potential osteoclast stimulatory factor in multiple myeloma. **Blood**,v.96, n.2, p. 671-675, July 2000.
- CHORLEY, B.N. et al. Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory genomic regions: current and developing technologies. **Mutation Research**,v.659, n.1-2, p. 147-157, July/Aug. 2008
- CHUNG, P.Y.; Van HUL, W. Paget's disease of bone: evidence for complex pathogenetic interactions. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v.41, n.5, p. 619-641, Apr. 2012.
- CLAY, F.E. et al. Novel interleukin-1 receptor antagonist exon polymorphisms and their use in allele-specific mRNA assessment. **Human Genetics**, v.97, n.6, p. 723-726, June 1996.
- 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, Jan 1980.
- COCHRAN, D.L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. **Journal of Periodontology**, v.79, n.8 Suppl, p.1569-76. Aug, 2008.
- COLIĆ, M.et al. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. **Molecular Immunology**, v.47, n.1, p. 101-113, Nov. 2009.
- CONSOLARO, A. **Reabsorções Dentárias nas especialidades clínicas**.3.ed. Maringá:

Dental Press, 2012.p.816.

CORK, M.J. et al. An allele of the interleukin-1 receptor antagonist as a genetic severity factor in alopecia areata. **Journal of Investigation Dermatology**,v.104, n.5 Suppl, p. 15S-16S, May 1995.

CORTES, M.I.; MARCENES, W.; SHEIHAM, A. Impact of traumatic injuries to the permanent teeth on the oral health-related quality of life in 12-14-year-old children. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**,v.30, n.3, p. 193-198, June 2002.

CULLINAN, M.P. et al. Progression of periodontal disease and interleukin-10 gene polymorphism. **Journal of Periodontal Research**, v.43, n.3, p.328-332. Jun, 2008.

CVEK, M. Prognosis of luxated non-vital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta-percha. A retrospective clinical study. **Endodontics Dental Traumatology**, v.8, n.2, p. 45-55, Apr. 1992.

DALLAS,S.L. et al. Dual role for the latent transforming growth factor-beta binding protein in storage of latent TGF-beta in the extracellular matrix and as a structural matrix protein. **The Journal Cell Biology**,v.131, n.2, p. 539-549, Oct. 1995

DANIS, V.A. Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. **Clinical and Experimental Immunology**, v.99, n.2, p. 303-310, Feb. 1995.

DAROSZEWSKA, A. et al. Susceptibility to Paget's disease of bone is influenced by a common polymorphic variant of osteoprotegerin. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.19, n.9, p. 1506-1511, Sept. 2004.

DAS, S.; DAS, A.K.; MURPHY, R.A. Experimental apexogenesis in baboons. **Endodontics and Dental Traumatology**,v.13, n.1, p. 31-35, Feb. 1997.

DAYER, J.M.Evidence for the biological modulation of IL-1 activity: the role of IL-1RA.. **Clinical and Experimental Rheumatology**,v.20, n.5 Suppl 27, p. S14-S20, Sept. /Oct. 2002.

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

De ROSSI, A.; ROCHA, L.B.; ROSSI, M.A. Interferon-gamma, interleukin-10, Intercellular adhesion molecule-1, and chemokine receptor 5, but not interleukin-4, attenuate the development of periapical lesions. **Journal of Endodontics**, v.34, n.1, p. 313-318, Jan. 2008.

De SÁ, A.R. et al. Association of CD14, IL1B, IL6, IL10 and TNFA functional gene polymorphisms with symptomatic dental abscesses. **International Endodontic Journal**, v.40, n.7, p. 563-572, July 2007.

DELAISSÉ, J.M. et al. Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. **Microscopy Research Technique**, v.61, n.6, p. 504-513, Aug. 2003.

DELAISSÉ, J.M. et al. Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. **Clinica Chimica Acta**,v.291, n.2, p. 223-234, Feb. 2000.

DELIVANIS,P.D.; SNOWDEN, R.B.; DOYLE, R.J. Localization of blood-borne bacteria in instrumented unfilled root canals. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**,v.52, n.4, p. 430-432. Oct. 1981.

DIGLLE, P. et al. **Analysis of longitudinal data**. 2. ed. Oxford: Statistical Science Series, 2003. 369p.

DOMINICI, R. et al. Cloning and functional analysis of the allelic polymorphism in the transcription regulatory region of interleukin-1 α . **Immunogenetics**, v.54, n.2, p. 82, May 2002.

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

209, 2001.

DONG,S.S. et al. Association analyses of RANKL/RANK/OPG gene polymorphisms with femoral neck compression strength index variation in Caucasians. **Calcified Tissue International**,v.85, n.2, p. 104-112, Aug. 2009.

DUTRA, W.O. et al. Implications of cytokine polymorphisms on the orchestration of the immune response: lessons learned from oral diseases. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.20, n.3, p. 223-232, 2009.

EBELEDER, K.A. et al. A study of replanted permanent teeth in different age groups. **Endodontics Dental Traumatology**, v.14, n.6, p. 274-278, Dec. 1998.

EHNEVID, H. et al. Periodontal healing in relation to radiographic attachment and endodontic infection. **Journal of Periodontology**,v.64, n.12, p. 1199-1204, Dec. 1993.

ENGBRETSON, S.P. et al. The influence of interleukin gene polymorphism on expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in periodontal tissue and gingival crevicular fluid. **Journal of Periodontology**,v.70, n.6, p. 567-573, June 1999.

ESKDALE, J. et al. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. **Proceedings National Academy Sciences USA**,v.95, n.16, p. 9465-9470, Aug. 1998.

ESTRELA C et al. Method to evaluate inflammatory root resorption by using cone beam computed tomography. **Journal of Endodontics**,v.35, n.11, p. 1491-7. Nov, 2009.

EVANS, K.E.; FOX, S.W. Interleukin-10 inhibits osteoclastogenesis by reducing NFATc1 expression and preventing its translocation to the nucleus. **BMC Cell Biology**,v.19, n.8, p. 4, Jan. 2007.

EVERTS, V. et al. Degradation of collagen in the bone-resorbing compartment underlying the osteoclast involves both cysteine-proteinases and matrix metalloproteinases. **Journal Cellular Physiology**,v.150, n.2, p. 221-231, Feb. 1992.

FIGDOR,D.;SUNDQVIST,G. A big role for the very small--understanding the endodontic microbial flora. **Australian Dental Journal**,v.52, n.1 Suppl, p. S38-S51, Mar. 2007.

FLORES MT et al., Guidelines for the management of traumatic dental injuries. II. Avulsion of permanent teeth. International Association of Dental Traumatology. **Dental Traumatology**, v.23, n.3, p.130-6. Jun, 2007.

FOUAD, A.F. IL-1 alpha and TNF-alpha expression in early periapical lesions of normal and immunodeficient mice. **Journal Dental Research**, v.76, n.9, p. 1548-1554, Sept. 1997.

GONDA, F. et al. Replantation: an analysis of 29 teeth. **Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology**, v.70, n.5, p. 650-655, Nov. 1990.

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, p. 10.3402, Jan. 2011.

GREGERSEN, P.K.; OLSSON, L.M. Recent advances in the genetics of autoimmune disease. **Annual Reviews Immunology**,v.27, p. 363-391, 2009.

GREGG, T.A.; BOYD, D.H. Treatment of avulsed permanent teeth in children. UK National Guidelines in Paediatric Dentistry. Royal College of Surgeons, Faculty of Dental Surgery. **International Journal of Paediatrics Dentistry**, v.8, n.1, p.75-81. Mar, 1998.

GRIEVE, W.G. et al. Prostaglandin E (PGE) and interleukin-1 beta (IL-1 beta) levels in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. **American Journal Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v.105, n.4, p. 369-374, Apr.

1994.

GROSSMAN, L.I Origin of microorganisms in traumatized, pulpless, sound teeth. **Journal of Dental Research**, v.46, n.3, p. 551-553, May/June 1967.

GÜLDEN, N. et al. Interleukin-1 polymorphisms in relation to external apical root resorption (EARR). **Journal of Orofacial Orthopedics**, v.70, n.1, p. 20-38, Jan. 2009.

GUROL C et al., A comparative study of the role of cytokine polymorphisms interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha in susceptibility to implant failure and chronic periodontitis. **International Journal of Oral Maxillofacial and Implants**, v.26, n.5, p.955-60. Sep-Oct, 2011.

GUSMÃO, R.C.G.F. **Estudo das metaloproteinases 2 e 9 e seus inibidores em diferentes formas clínicas da doença de chagas.** 2012 [Tese de doutorado] Fundação Oswaldo Cruz: Centro de Pesquisas René Rachou. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Belo Horizonte.

HAMMARSTRÖM, L. et al. Effect of calcium hydroxide treatment of periodontal repair and root resorption. **Endodontics Dental Traumatology**, v.2, n.5, p. 184-189, Oct. 1986c.

HAMMARSTRÖM, L. et al. Replantation of teeth and antibiotic treatment. **Endodontics Dental Traumatology**, v.2, n.2, p. 51-57, May 1986b.

HAMMARSTRÖM, L. et al. Tooth avulsion and replantation - a review. **Endodontics Dental Traumatology**, v.2, n.1, p. 1-8, Feb. 1986a.

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

HAMMARSTRÖM, L.; LINDSKOG, S. Factors regulating and modifying root resorption. **Procedures Finnish of Dental Society**, v.88, n.Suppl 1, p. 115-123, 1992.

HANNAS, A.R. et al. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.65, n.1, p. 1-13, Feb. 2007.

HARENDZA, S. Linked common polymorphisms in the gelatinase a promoter are associated with diminished transcriptional response to estrogen and genetic fitness. **Journal of Biology and Chemistry**, v.278, n.23, p.20490-9. Jun, 2003.

HAROKOPAKIS-HAJISHENGALLIS, E. Physiologic root resorption in primary teeth molecular and histological events. **Journal of Oral Science**, v.49, n.1, p. 1-12, 2007.

HARTSFIELD, J.J. Pathways in external apical root resorption associated with orthodontia. **Orthodontics Craniofacial Research**, v.12, n.3, p. 236-242, Aug. 2009.

HASEGAWA, N. et al. Immunohistochemical characteristics of epithelial cell rests of Malassez during cementum repair. **Journal of Periodontology Research**, v.38, n.1, p. 51-56, Feb. 2003.

HATTERSLEY, G. Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) is essential for osteoclast formation in vitro. **Biochem Biophys Res Commun**, v.177, n.1, p.526-31. May, 1991.

HAYASHI, N. et al. Biological activity of a novel non peptide antagonist to the interleukin-6 receptor 20S,21-epoxy-resibufogenin-3-formate. **Journal Pharmacology Experimental Therapeutics**, v.303, n.1, p. 104-109, Oct. 2002.

HAYASHI, N. et al. T helper 17 cells mediate the osteo/odontoclastogenesis induced by excessive orthodontic forces. **Oral Diseases**, v.18, n.4, p. 375-388, May 2012.

HIDALGO, M.M.; ITANO, E.M.; CONSOLARO, A. Humoral response of patients with dental trauma and consequent replacement resorption. **Dental Traumatology**, v.21, n.4, p. 218-221, 2005.

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, 2009a.
- HINCKFUSS, S.E.; MESSER, L.B. An evidence-based assessment of the clinical guidelines for replanted avulsed teeth. Part II: prescription of systemic antibiotics. **Dental Traumatology**, v.25, n.1, p. 158-164, 2009c.
- HINCKFUSS, S.E.; MESSER, L.B. Splinting duration and periodontal outcomes for replanted avulsed teeth: a systematic review. **Dental Traumatology**, v.25, n.1, p. 150-157, 2009b.
- HUANG, C.H. et al. Osteoprotegerin genetic polymorphisms and age of symptom onset in ankylosing spondylitis. **Rheumatology**, Oxford, v.50, n.2, p. 359-365, Feb. 2011.
- HUGHES, A.E. et al. Mutations in TNFRSF11A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis. **Nature Genetics**, v.24, n.1, p. 45-48, Jan. 2000.
- HURME, M.; SANTTILA, S. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are coordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1 I genes. **European Journal of Immunology**, v.28, n.8, p. 2598-2602, Aug. 1998.
- IGLESIAS-LINARES, A. et al. Interleukin 1 gene cluster SNPs (rs1800587, rs1143634) influences post-orthodontic root resorption in endodontic and their contralateral vital control teeth differently. **International Endodontic Journal**, v.45, n.11, p. 1018-1026, Nov. 2012c.
- IGLESIAS-LINARES, A. et al. Interleukin 1 receptor antagonist (IL1RN) genetic variations condition post-orthodontic external root resorption in endodontically-treated teeth. **Histology and Histopathology**, v.28, n.6, p. 767-773, June 2013.
- IGLESIAS-LINARES, A. et al. Post orthodontic external root resorption is associated with IL1 receptor antagonist gene variations. **Oral Disease**, v.18, n.2, p. 198-205, Mar. 2012a.
- IGLESIAS-LINARES, A. et al. Post orthodontic external root resorption in root-filled teeth is influenced by interleukin-1 β polymorphism. **Journal of Endodontics**, v.38, n.3, p. 283-287, Mar. 2012b.
- INOUE, K. et al. A crucial role for matrix metalloproteinase 2 in osteocytic canalicular formation and bone metabolism. **The Journal of Biology Chemistry**, v.281, n.44, p. 33814-33824, Nov. 2006.
- ISHIHARA, Y. et al. Gingival crevicular interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist levels in periodontally healthy and diseased sites. **Journal Periodontal Research**, v.32, n.6, p. 524-549, Aug. 1997.
- IWASAKI, L.R. et al. Speed of tooth movement is related to stress and IL-1 gene polymorphisms. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v.130, n.6, p. 698.e1-698.e9, Dec. 2006.
- IWASAKI, L.R. et al. Human interleukin-1 beta and interleukin - 1 receptor antagonist secretion and velocity of tooth movement. **Archives of Oral Biology**, v.46, n.2, p. 185-189, Feb. 2001.
- JACQ, L. The MMP2 rs243865-T allele is not a major genetic factor for rheumatoid arthritis in the French Caucasian population. **International Journal of Immunogenetics**, v.35, p. 97-99, Apr. 2008.
- JARADAT, S.M. et al. Association of interleukin-10 gene promoter polymorphisms with chronic and aggressive periodontitis. **Oral Diseases**, v.18, n.3, p. 271-279, Apr. 2012.
- JENKINS, G. The role of proteases in transforming growth factor-beta activation. **International Journal Biochemistry Cellular Biology**, v.40, n.6-7, p. 1068-1078, 2008.
- KABASHIMA, H. et al. An interleukin-1 inhibitor in gingival crevicular fluid of patients with chronic inflammatory periodontal disease. **Infect Immunology**, v.59,

n.11, p. 4271-4274, Nov. 1991.

KADKHODAZADEH, M. et al. Analysis of osteoprotegerin (OPG) gene polymorphism in Iranian patients with chronic periodontitis and peri-implantitis. A cross-sectional study. **European Journal of Oral Implantology**, v.5, n.4, p. 381-388, 2012.

KADKHODAZADEH, M. et al. Analysis of RANKL gene polymorphism (rs9533156 and rs2277438) in Iranian patients with chronic periodontitis and periimplantitis. **Archives of Oral Biology**, v.58, n.5, p. 530-536, May 2013.

KATZ, J. et al. Genetic polymorphisms and other risk factors associated with bisphosphonate induced osteonecrosis of the jaw. **International Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v.40, n.6, p. 605-611, June 2011.

KAWAGUCHI, Y. et al. Contribution of single nucleotide polymorphisms of the IL1A gene to the cleavage of precursor IL-1alpha and its transcription activity. **Immunogenetics**, v.59, n.6, p. 441-448, June 2007.

KAWASHIMA, N. et al. Kinetics of RANKL, RANK and OPG expressions in experimentally induced rat periapical lesions. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics**, v.103, n.5, p. 707-711, May 2007.

KAWASHIMA, N.; STASHENKO, P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. **Archives of Oral Biology**, v.44, n.1, p. 55-66, 1999.

KEINAN, D.; COHEN, R.E. The significance of epithelial rests of Malassez in the periodontal ligament. **Journal of Endodontics**, v.39, n.5, p. 582-587, May 2013.

KERRIGAN, J.J.; MANSELL, J.P.; SANDY, J.R. Matrix turnover. **Journal of Orthodontics**, v.27, n.3, p. 227-233, Sept. 2000.

KIM, J.G. et al. Association between osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK), and RANK ligand (RANKL) gene polymorphisms and circulating OPG, soluble RANKL levels, and bone mineral density in Korean postmenopausal women. **Menopause**, v.14, n.5, p. 913-918, Sept./Oct. 2007.

KIM, M.S. et al. Induction of chemokines and chemokine receptors CCR2b and CCR4 in authentic human osteoclasts differentiated with RANKL and osteoclast like cells differentiated by MCP-1 and RANTES. **Journal Cellular Biochemistry**, v.97, n.3, p. 512-518, Feb. 2006.

KINIRONS, M.J. et al. Variations in the presenting and treatment features in reimplanted permanent incisors in children and their effect on the prevalence of root resorption. **British Dental Journal**, v.189, n.5, p. 263-266, Sept. 2000.

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 Dental Traumatology**, v.15, n.6, p. 269-272, Dec. 1999.

KUBISTOVA, Z.; MRAZEK, F.; PETREK, M. Polymorphisms of the immune response genes: selected biological, methodical and medical aspects. **Biomedical Papers Medicine Faculty University Palacky Olomouc Czech Repub.** v.153, n.2, p. 93-102, June 2009.

KUDO, O., SABOKBAR, A., POCOCK, A., ITONAGA, I., FUJIKAWA, Y., ATHANASOU, N.A. Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. **Bone**, v.32, n.1, p. 1-7, Jan. 2003.

KUNII, R. et al. Role of interleukin-6 in orthodontically induced inflammatory root resorption in humans. **Korean Journal Orthodontics**, v.43, n.6, p. 294-301, Dec. 2013.

KVINNSLAND, I.; HEYERAAS, K.J. Cell renewal and ground substance formation in replanted cat teeth. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.48, n.3, p. 203-215, June 1990.

- LAM, J. et al. TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. **Journal Clinical Investigation**, v.106, n.12, p. 1481-1488, Dec. 2000.
- LANGDAHL, B.L. et al. Polymorphisms in the osteoprotegerin gene are associated with osteoporotic fractures. **Journal Bone Mineral Research**, v.17, n.7, p. 1245-1255, July 2002.
- LAPIDOT, T.; DAR, A.; KOLLET, O. How do stem cells find their way home? **Blood**, v.106, n.6, p. 1901-1910, Sept. 2005.
- LARSSON, L. et al. Interleukin-10 genotypes of the -1087 single nucleotide polymorphism influence sp1 expression in periodontitis lesions. **Journal of Periodontology**, v.82, n.9, p. 1376-1382, Sept. 2011.
- LEE, Y.H.; WOO, J.; CHOI, S.J. Associations between osteoprotegerin polymorphisms and bone mineral density: a meta-analysis. **Molecular Biology Reports**, v.37, n.1, p. 227-234, Jan. 2010.
- LEKIC, P.; McCULLOCH, C.A. Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. **Anatomical Record**, v.245, n.2, p. 327-341, June 1996.
- LEKIC, P.C.; KENNY, D.J.; BARRETT, E.J. The influence of storage conditions on the clonogenic capacity of periodontal ligament cells: implications for tooth replantation. **International Endodontics Journal**, v.31, n.2, p. 137-140, Mar. 1998.
- LENGHEDEN A., BLOMLÖF L., LINDSKOG S. Effect of immediate calcium hydroxide treatment and permanent root-filling on periodontal healing in contaminated replanted teeth. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v.99, n.2, p. 139-146, Apr 1991.
- LIANG, K.; ZEGER, S. Longitudinal data analysis using generalized linear models. **Biometrics**, v.42, n.4, p.13-22, 1986.
- LIN, W.P. et al. Interleukin-10 promoter polymorphisms associated with susceptibility to lumbar disc degeneration in a Chinese cohort. **Genetics and Molecular Research**, v.10, n.3, p. 1719-1727, 2011.
- LINDSKOG, S. et al. The role of the necrotic periodontal membrane in cementum resorption and ankylosis. **Endodontics Dental Traumatology**, v.1, n.3, p. 96-101, June 1985.
- LINDSKOG, S.; BLOMLÖF, L. Influence of osmolality and composition of some storage media on human periodontal ligament cells. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.40, p. 435-441, 1982.
- LINDSKOG, S.; BLOMLÖF, L.; HAMMARSTRÖM, L. Comparative effects of parathyroid hormone on osteoblasts and cementoblasts. **Clinical Journal of Periodontology**, v.14, n.7, p. 386-389, Aug. 1987a.
- LINDSKOG, S.; BLOMLÖF, L.; HAMMARSTRÖM, L. Cellular colonization of denuded root surfaces in vivo: cell morphology in dentin resorption and cementum repair. L. **Journal Clinical of Periodontology**, v.14, n.7, p. 390-395, Aug. 1987b.
- LINDSKOG, S.; BLOMLÖF, L.; HAMMARSTRÖM, L. Dentin resorption in replanted monkey incisors. Morphology of dentinoclast spreading in vivo. **Journal Clinical of Periodontology**, v.15, n.6, p. 365-370, July 1988a.
- LINDSKOG, S.; BLOMLÖF, L.; HAMMARSTRÖM, L. Evidence for a role of odontogenic epithelium in maintaining the periodontal space. **Journal Clinical of Periodontology**, v.15, n.6, p. 371-3, July 1988b.
- LINHARTOVA, P. et al. IL1 gene polymorphisms in relation to external apical root resorption concurrent with orthodontia. **Oral Disease**, v.19, n.3, p. 262-270, Apr. 2013.
- LITTLE, J. Reporting, appraising and integrating data genotype prevalence and gene

- disease associations **American Journal of Epidemiology**, v.156, n.4, p.300-310, 2002.
- LIU, D.; YAO, S.; WISE, G.E. Effect of interleukin-10 on gene expression of osteoclastogenic regulatory molecules in the rat dental follicle. **European Journal of Oral Sciences**, v.114, n.1, p. 42-49, Feb. 2006.
- LIU, X.H. et al. Cross-talk between the interleukin-6 and prostaglandin E(2) signaling systems results in enhancement of osteoclastogenesis through effects on the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK) ligand/RANK system. **Endocrinology**, v.146, n.4, p. 1991-1998, Apr. 2005.
- LOO, W.T. et al. Gene polymorphism and protein of human pro- and anti-inflammatory cytokines in Chinese healthy subjects and chronic periodontitis patients. **Journal Translational Medicine**, v.10, n. Suppl 1:, p. S8, Sept. 2012.
- LORENZO, J.; HOROWITZ, M.; CHOI, Y. Osteoimmunology: Interactions of the bone and the immune system. **Endocrine Reviews**, v.29, n.4, p. 403–440, June 2008.
- LOSSDÖRFER, S.; GÖTZ, W.; JÄGER, A. Immunohistochemical localization of receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) and its ligand (RANKL) in human deciduous teeth. **Calcified Tissue International**, v.71, n.1, p. 45-52, July 2002.
- LOVE, R.M. Bacterial penetration of the root canal of intact incisor teeth after a simulated traumatic injury. **Endodontic Dental Traumatology**, v.12, n.6, p. 289-293, Dec. 1996.
- LOVE, R.M.; JENKINSON, H.F. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. **Critical Review Oral Biological Medicine**, v.13, n.2, p. 171-183, 2002.
- MA, T. et al. Human interleukin-1-induced murine osteoclastogenesis is dependent on RANKL, but independent of TNF-alpha. **Cytokine**, v.26, n.3, p. 138-144, May 2004.
- MACKIE, I.C.; WORTHINGTON, H.V. An investigation of replantation of traumatically avulsed permanent incisor teeth. **British Dental Journal**, v.172, n.1, p. 17-20, Jan. 1992.
- MALAYSIAN MINISTRY OF HEALTH. **Clinical practice guidelines: management of avulsed permanent anterior teeth in children**. 2010. Disponível em URL: <<http://www.moh.gov.my>>.
- MANGASHETTI, L.S.; KHAPLI, S.M.; WANI, M.R. IL-4 inhibits bone-resorbing activity of mature osteoclasts by affecting NF-kappa B and Ca²⁺ signaling. **Journal of Immunology**, v.175, n.2, p. 917-925, July 2005.
- MANOURY-SCHWARTZ, B. et al. High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN-gamma receptors. **Journal Immunology**, v.158, n.11, p. 5501-5506, June 1997.
- MARCENES W, RYDÅ U. Socio-Psychological aspects of traumatic dental injuries. In: ANDREASEN, J.O.; ANDREASEN, F.M.; ANDERSSON, L. **Textbook and color atlas of traumatic injuries to teeth**. 4. ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. p. 197-205.
- MARTON, I.J. et al. Differential in situ distribution of interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and Rantes in human chronic periapical granuloma. **Oral Microbiology and Immunology**, v.15, n.1, p. 63-65, Feb. 2000.
- McCULLOCH, C.A. Basic considerations in periodontal wound healing to achieve regeneration. **Periodontology** 2000. 1993 Feb;1(1):16-25.
- McCULLOCH, C.A. et al. Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations. **Anatomical Record**, v.219, n.3, p. 233-242, Nov. 1987.
- MEDLEY, T.L. et al. Matrix metalloproteinase-9 genotype influences large artery stiffness through effects on aortic gene and protein expression. **Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology**, v.24, n.8, p. 1479-1484, Aug. 2004.

- MEIKLE, M.C. et al. Human osteoblasts in culture synthesize collagenase and other matrix metalloproteinases in response to osteotropic hormones and cytokines. **Journal of Cell Sciences**, v.103, n.Pt 4, p. 1093-1099, Dec. 1992.
- MENCEJ-BEDRAČ, S. et al. TNFRSF11B gene polymorphisms 1181G > C and 245T > G as well as haplotype CT influence bone mineral density in postmenopausal women. **Maturitas**, v.69, n.3, p. 263-267, July 2011.
- MENEZES, R. et al. The potential role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) in the attenuation of inflammatory reaction and alveolar bone loss associated with apical periodontitis. **Journal of Endodontics**, v.34, n.12, p. 1480-1484, Dec. 2008.
- MENEZES-SILVA, R. et al. Genetic susceptibility to periapical disease: conditional contribution of MMP2 and MMP3 genes to the development of periapical lesions and healing response. **Journal of Endodontics**, v.38, n.5, p. 604-607, May 2012.
- MICKEY, R.M.; GREENLAND, S. The impact of confounder selection criteria on effect estimation. **American Journal of Epidemiology**, v.129, n.1, p. 125-137, Jan. 1989.
- MISHRA, A. et al. Association of matrix metalloproteinases (MMP2, MMP7 and MMP9) genetic variants with left ventricular dysfunction in coronary artery disease patients. **Clinical Chimica Acta**, v.413, n.19-20, p. 1668-1674, Oct. 2012.
- MÖLLER, R.J.R. et al. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v.89, p. 475-484, 1981.
- MOORREES, C.F.A.; FANNING, E.A.; HUNT, E.E. Age variation of formation stages for ten permanent teeth. **Journal of Dental Research**, v.42, p. 1490-1502, Nov./Dec. 1963.
- MORSANI, J.M. et al. Genetic predisposition to persistent apical periodontitis. **Journal of Endodontics**, v.37, n.4, p. 455-459, Apr. 2011.
- MOSIG, R.A. et al. Loss of MMP-2 disrupts skeletal and craniofacial development and results in decreased bone mineralization, joint erosion and defects in osteoblast and osteoclast growth. **Human Molecular Genetic**, v.16, n.9, p. 1113-1123, May 2007.
- NAGASE, H.; VISSÉ, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovascular Research**, v.69, n.3, p. 562-573, Feb. 2006.
- NAKAMURA, I.; JIMI, E. Regulation of osteoclast differentiation and function by interleukin-1. **Vitamins and Hormones**, v.74, p. 357-370, 2006.
- NAKANO, Y. et al. Expressions of RANKL/RANK and M-CSF/c-fms in root resorption lacunae in rat molar by heavy orthodontic force. **European Journal Orthodontics**, v.33, n.4, p. 335-343, Aug. 2011.
- NANCE, R.S. et al. Diagnosis of external root resorption using TACT (tuned-aperture computed tomography). **Endodontics and Dental Traumatology**, v.16, n.1, p.24-8.Feb, 2000.
- NASJLETI, C.E.; CASTELLI, W.A.; CAFFESE, R. The effect of different splinting times on replantation of teeth in monkeys. **Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology**, v.53, n.6, p. 557-566, June 1982.
- NGUYEN, P-M.T.; KENNY, D.J.; BARRETT, D.J. Socio-economic burden of permanent incisor replantation on children and parents. **Dental Traumatology**, v.20, n.3, p. 123-133, 2004.
- NISHIOKA, M. et al. Tooth replantation in germ-free and conventional rats. **Endodontics Dental Traumatology**, v.14, n.4, p. 163-173, Aug. 1998.
- OHMORI, H. et al. Linkage and association analyses of the osteoprotegerin gene locus with human osteoporosis. **Journal of Human Genetics**, v.47, n.8, p. 400-406, 2002.

- OIKARINEN, K. Tooth splinting: a review of the literature and consideration of the versatility of a wire-composite splint. **Endodontics Dental Traumatology**, v.6, n.6, p. 237-250, Dec. 1990.
- OKADA, Y. et al. Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. **Laboratory Investigation**, v.72, n.3, p. 311-322, Mar. 1995.
- OKAMATSU, Y. et al. MIP-1 gamma promotes receptor-activator-of-NF-kappa-B-ligand-induced osteoclast formation and survival. **Journal of Immunology**, v.173, n.3, p. 2084-2090, Aug. 2004.
- OKAMURA, T. et al. Detection of collagenase mRNA in odontoclasts of bovine root-resorbing tissue by in situ hybridization. **Calcified Tissue International**, v.52, n.4, p. 325-330, Apr. 1993.
- OSHIRO, T. et al. Immunolocalization of vacuolar-type H⁺-ATPase, cathepsin K, matrix metalloproteinase-9, and receptor activator of NFkappaB ligand in odontoclasts during physiological root resorption of human deciduous teeth. **Anatomical Record**, v.264, n.3, p. 305-311, Nov. 2001.
- PARK, O.J. et al. The association of Osteoprotegerin gene polymorphisms with periodontitis. **Oral Diseases**, v.14, n.5, p. 440-444, July 2008.
- PARRA, F.C. et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, n.1, p. 177-182, Jan. 2003.
- PEREIRA, S. et al. Polymorphisms of genes encoding P2X7R, IL-1B, OPG and RANK in orthodontic-induced apical root resorption. **Oral Disease**, Oct. 2013 (online).
- PETROVIC, B. et al. Factors related to treatment and outcomes of avulsed teeth. **Dental Traumatology**, v.26, n.1, p. 52-59, Feb. 2010.
- PIERCE, A. Experimental basis for the management of dental resorption. **Endodontics Dental Traumatology**, v.5, n.6, p. 255-265, Dec. 1989.
- PIERCE, A.M.; LINDSKOG, S.; HAMMARSTRÖM, L. Osteoclasts: structure and function. **Electron Microscopical Review**, v.4, n.1, p. 1-45, 1991.
- PIGOSSI et al., 2012
- PITARU, S.; MCCULLOCH, C.A.; NARAYANAN, S.A. Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. **Journal of Periodontal Research**, v.29, n.2, p. 81-94, Mar. 1994.
- PLANELLO, A.C. et al. Association of matrix metalloproteinase gene polymorphism with temporomandibular joint degeneration. **European Journal Oral Sciences**, v.119, n.1, p. 1-6, Feb. 2011.
- POCIOT, F. et al. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. **European Journal Clinical Investigation**, v.22, n.6, p. 396-402, June 1992.
- POHL, Y.; FILIPPI, A.; KIRSCHNER, H. Results after replantation of avulsed permanent teeth. III. Tooth loss and survival analysis. Endodontic considerations. **Dental Traumatology**, v.21, n.2, p.102-10. Apr, 2005.
- POHL, Y.; FILIPPI, A.; KIRSCHNER, H. Results after replantation of avulsed permanent teeth. I. Endodontic considerations. **Dental Traumatology**, v.21, n.2, p.80-92. Apr, 2005.
- POHL, Y.; FILIPPI, A.; KIRSCHNER, H. Results after replantation of avulsed permanent teeth. II. Periodontal healing and the role of physiologic storage and antiresorptive-regenerative therapy. **Dental Traumatology**, v.21, n.2, p.93-101. Apr, 2005.
- PRICE, S.J.; GREAVES, D.R.; WATKINS, H. Identification of novel, functional

- genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene: role of Sp1 in allele-specific transcriptional regulation. **Journal Biology Chemistry**, v.276, n.10, p. 7549-7558, Mar. 2001.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: URL <http://www.R-project.org>. 2008.
- RAFTER, M. Apexification: a review. **Dental Traumatology**, v.21, n.1, p. 1-8, Feb. 2005.
- REGO, E.B. et al. Ultrasound stimulation attenuates root resorption of rat replanted molars and impairs tumor necrosis factor- α signaling in vitro. **Journal Periodontal Research**, v.46, n.6, p. 648-654, Dec. 2011.
- RHOUMA, O.; MCMAHON, A.D.; WELBURY, R.R. Early prognostic and outcome prediction model for replanted avulsed teeth. **European Archive of Pediatric Dentistry**, v.13, n.4, p. 303-309, 2013.
- RÔÇAS, I.N.; SIQUEIRA JÚNIOR, J.F. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. **Journal Clinical of Microbiology**, v.46, n.11, p. 3599-3606, Nov. 2008.
- RODRIGUEZ-LOPEZ, J. et al. Regulatory polymorphisms in extracellular matrix protease genes and susceptibility to rheumatoid arthritis: a case-control study. **Arthritis Research Therapy**, v.8, n.1, p. R1, 2006.
- ROSKAMP, L. et al. influence of atopy in the prognosis of the replantation of avulsed teeth. **Journal of Periodontology**, v.80, n.7, p. 1121-1124, July 2009.
- ROSKAMP, L. et al. The positive influence of atopy on the prognosis of avulsed and replanted teeth despite differences in post-trauma management. **Journal of Endodontics**, v.37, n.4, p. 463-465, Apr. 2011.
- ROTHER, L. et al. Human osteoclasts and osteoclast-like cells synthesize and release high basal and inflammatory stimulated levels of the potent chemokine interleukin-8. **Endocrinology**, v.139, n.10, p. 4353-4363, Oct. 1998.
- RUNGVECHVUTTIVITTAYA, S.; OKIJI, T.; SUDA, H. Responses of macrophage-associated antigen-expressing cells in the dental pulp of rat molars to experimental tooth replantation. , v.43, n.9, p. 701-710, Sept. 1998.
- SABAT, R. et al. Biology of interleukin – 10. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.21, n.5, p. 331-344, Oct. 2010.
- SABETI, M. et al. Detection of receptor activator of NF-kappa beta ligand in apical periodontitis. **Journal of Endodontics**, v.31, n.1, p. 17-18, Jan. 2005.
- SAE-LIM, V.; WANG, C.Y.; TROPE, M. Effect of systemic tetracycline and amoxicillin on inflammatory root resorption of replanted dog's teeth. **Endodontics and Dental Traumatology**, v.14, n.5, p. 216-220, Oct. 1998b.
- SAE-LIM, V.; YUEN, K.W. An evaluation of after-office-hour dental trauma in Singapore. **Endodontics and Dental Traumatology**, v. 13, n.4, p. 164-70. Aug, 1997.
- SAE-LIM, V. et al. The effect of systemic tetracycline on resorption of dried replanted dog's teeth. **Endodontics and Dental Traumatology**, v.14, n.3, p. 127-132, June 1998a.
- SALLA, J.T. et al. The effect of IL-1 receptor antagonist on orthodontic tooth movement in mice. **Archives of Oral Biology**, v.57, n.5, p. 519-524, May 2012.
- SALO, J. et al. Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis. **Science**, v.276, n.5310, p. 270-273, Apr. 1997.
- SASAKI, H. et al. IL-10, but not IL-4, suppresses infection-stimulated bone resorption in vivo. **Journal of Immunology**, v.165, n.7, p. 3626-3630, Oct. 2000.
- SASAKI, T. Differentiation and functions of osteoclasts and odontoclasts in

- mineralized tissue resorption. **Microscopic Research an Technique**, v.61, n.6, p. 483-495, Aug. 2003.
- SASAKI, T. et al. Possible role of cementoblasts in the resorbant organ of human deciduous teeth during root resorption. **Journal Periodontal Research**, v.25, n.3, p. 143-151, May 1990.
- SASIENE, P.D. From genotypes to genes: doubling the sample size. **Biometrics**, v.53, n.4, p. 1253-1261, Dec. 1997.
- SASSONE,L.M. et al. A microbiological profile of unexposed and exposed pulp space of primary endodontic infections by checkerboard DNA-DNA hybridization. **Journal of Endodontics**,v.38, n.7, p. 889-893, July 2012.
- SCHATZ, J.P.; HAUSHERR, C.; JOHO, J.P. A retrospective clinical and radiologic study of teeth re-implanted following traumatic avulsion. **Endodontic Dental Traumatology**,v.11, n.5, p. 235-239, Oct. 1995.
- SCHEVEN, B.A. et al. Macrophage-inflammatory protein-1alpha regulates preosteoclast differentiation in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communication**,v.254, n.3, p. 773-778, Jan. 1999.
- SHAH,P.; ASHLEY,P. Routine systemic antibiotic prescription in the management of permanent avulsed teeth--should we stop? **Dental Traumatology**,v.26, n.3, p. 301, June 2010.
- SHAW, D.R.; GRIFFIN JÚNIOR, F.M. Phagocytosis requires repeated triggering of macrophage phagocytic receptors during particle ingestion. **Nature**, v.289, n.5796, p. 409-411, Jan. 1981.
- SHIGEYAMA, Y. et al. Expression of adhesion molecules during tooth resorption in feline teeth: a model system for aggressive osteoclastic activity. **Journal Dental Research**,v.75, n.9, p. 1650-1657, Sept. 1996.
- SHIMAUCHI, H. et al. Balance of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist in human periapical lesions. **Journal of Endodontics**, v.24, n.2, p. 116-119, Feb. 1998.
- SHIOTANI, A.; SHIBASAKI, Y.; SASAKI, T. Localization of receptor activator of NF kappaB ligand, RANKL, in periodontal tissues during experimental movement of rat molars. **Journal Electron Microscopy**, Tokyo, v.50, n.4, p. 365-369, 2001.
- SHOEMAKER, J.; PAINTER, I.; WEIR, B.S.A bayesian characterization of Hardy-Weinberg disequilibrium. **Genetics**,v.149,p. 2079-2088, 1998.
- SHULMAN, L.B.; GEDALIA, I.; FEINGOLD, R.M. Fluoride concentration in root surfaces and alveolar bone of fluoride-immersed monkey incisors three weeks after replantation. **Journal Dental Research**,v.52, n.6, p. 1314-1316, Nov./Dec. 1973.
- SILVA, T.A. et al. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. **Journal Dental Research**, v.86, n.4, p. 306-319, Apr. 2007.
- SILVA, T.A. et al. Cytokine and chemokine response of bone cells after dentin challenge in vitro. **Oral Diseases**, v.10, n.5, p. 258-264, Sept. 2004a.
- SILVA, T.A.; ROSA, A.L.; LARA, V.S. Dentin matrix proteins and soluble factors: intrinsic regulatory signals for healing and resorption of dental and periodontal tissues? **Oral Diseases**,v.10,n.2, p.63-74. Mar, 2004.
- SIQUEIRA JÚNIOR, J.F. et al. Relationship between Fcgamma receptor and interleukin-1 gene polymorphisms and post-treatment apical periodontitis. **Journal of Endodontics**, v.35, n.9, p. 1186-1192, Sept. 2009.
- SIQUEIRA JÚNIOR, J.F.; RÔÇAS, I.N. Diversity of endodontic microbiota revisited. **Journal of Dental Research**, v.88, n.11, p. 969-981, Nov. 2009.
- SIQUEIRA JÚNIOR, J.F.; ROÇAS,I.N.; ROSADO,A.S. Investigation of bacterial communities associated with asymptomatic and symptomatic endodontic infections by

- denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting approach. **Oral Microbiology and Immunology**, v.19, n.6, p. 363-370, Dec. 2004.
- SOARES, A.J.; GOMES, B.P.F.A.; ZAIA, A.A.; SOUZA-FILHO, F.J. Relationship between clinical-radiographic evaluation and outcome of teeth replantation. **Dental Traumatology**, v.24, n.2, p.183-8. Apr, 2008.
- SOEDARSONO, N. et al. Evaluation of RANK/RANKL/OPG gene polymorphisms in aggressive periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, v.41, n.5, p. 397-404, Oct. 2006.
- SPSS INC. Released 2008. **SPSS Statistics for Windows**, Version 17.0. Chicago: SPSS Inc., 2008.
- SUNDQVIST G. **Bacteriological studies of necrotic dental pulps**. Odontological Dissertation no.7, University of Umea, Umea, Sweden, 1976.
- TAKAHASHI, N. et al. Role of colony-stimulating factors in osteoclast development. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.6, n.9, p. 977-985, Sept. 1991.
- TAKAYANAGI, H. et al. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. **Nature**, v.408, n.6812, p. 600-605, Nov. 2000.
- TAKEICHI, O. et al. Expression of inflammatory cytokine genes in vivo by human alveolar bone-derived polymorphonuclear leukocytes isolated from chronically inflamed sites of bone resorption. **Calcified Tissue International**, v.58, n.4, p. 244-248, Apr. 1996.
- TANI-ISHII, N.; WANG, C.Y.; STASHENKO, P. Immunolocalization of bone-resorptive cytokines in rat pulp and periapical lesions following surgical pulp exposure. **Oral Microbiology and Immunology**, v.10, n.4, p. 213-219, Aug. 1995.
- TANNURE, P.N. et al. MMP13 polymorphism decreases risk for dental caries. **Caries Research**, v.46, p. 401-407, 2012.
- THIBODEAU, B.; TROPE, M. Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: case report and review of the literature. **Pediatric Dentistry**, v.29, n.1, p. 47-50, Jan./Feb. 2007.
- TOMOYASU, Y. et al. External apical root resorption and the interleukin-1B gene polymorphism in the Japanese population. **Orthodontics Waves**, v.68, n.4, p.152-157, Oct. 2009
- TORNECK, C.D. Effects and clinical significance of trauma to the developing permanent dentition. **Dental Clinical North America**, v.26, n.3, p. 481-504, July 1982.
- TRIKALINOS, T.A.; SALANTI, G.; KHOURY, M.J.; IOANNIDIS, J.P. Impact of violations and deviations in Hardy-Weinberg equilibrium on postulated gene-disease associations. **American Journal of Epidemiology**, v.163, n.4, p. :300-9. Feb 2006.
- TROPE, M. et al. Effect of different endodontic treatment protocol on periodontal repair and root resorption of replanted teeth. **Journal of Endodontics**, v.18, n.10, p. 492-496, Oct. 1992.
- TROPE, M. et al. Short vs. long-term calcium hydroxide treatment of established inflammatory root resorption in replanted dog teeth. **Endodontic and Dental Traumatology**, v.11, n.3, p. 124-128, June 1995.
- TURNER, D.M. et al. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **European Journal of Immunogenetics**, v.24, n.1, p. 1-8, Feb. 1997.
- TYROVOLA, J.B. et al. Root resorption and the OPG/RANKL/RANK system: a mini review. **Journal of Oral Sciences**, v.50, n.4, p. 367-376, Dec. 2008.
- UDOYE, C.I.; HAMID, J.; PAUL, V.A. Transport media for avulsed teeth: A review. **Australian Endodontic Journal**, v.38, p. 129-136, 2012.
- UELAND, T. et al. No associations between OPG gene polymorphisms or serum levels

- and measures of osteoporosis in elderly Australian women. **Bone**, v.40, n.1, p. 175-181, Jan, 2007.
- UEMATSU, S.; MOGI, M.; DEGUCHI, T. Interleukin (IL)-1 beta, IL-6, tumor necrosis factor-alpha, epidermal growth factor, and beta 2-microglobulin levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. **Journal of Dental Research**, v.75, n.1, p. 562-567, Jan. 1996.
- Van BEZOOIJEN RL et al. IL-1alpha, IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha steady-state mRNA levels analyzed by reverse transcription-competitive PCR in bone marrow of gonadectomized mice. **J Bone Miner Res**, v.13, n.2, p.185-94. Feb, 1998.
- VASKŮ, V. et al. Genotype association of C -735) T polymorphism in matrix metalloproteinase 2 gene with G(8002) A endothelin 1 gene with plaque psoriasis. **Dermatology**, v.204, n.4, p. 262-265, 2002.
- WAGNER, J. et al. Prevalence of OPG and IL-1 gene polymorphisms in chronic periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v.34, n.10, p. 823-827, Oct. 2007.
- WANG, C.Y.; STASHENKO, P. Characterization of bone-resorbing activity in human periapical lesions. **Journal of Endodontics**, v.19, n.3, p. 107-111, Mar. 1993.
- WEDER, P.; Von ARX, T.; CHAPPUIS, V. Treatment outcome of 42 replanted permanent incisors with a median follow-up of 2.8 years. **Schweiz Monatsschr Zahnmedin**, v.121, n.4, p. 312-320, 2011.
- WESSELINK, P.R.; BEERTSEN, W.The prevalence and distribution of rests of Malassez in the mouse molar and their possible role in repair and maintenance of the periodontal ligament. **Archives of Oral Biology**, v.38, n.5, p. 399-403, May 1993.
- WISE, G.E. et al. Osteoprotegerin and osteoclast differentiation factor in tooth eruption. **Journal of Dental Research**, v.79, n.12, p. 1937-1942, Dec 2000.
- WISE, G.E.; KING, G.J. Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. **Journal of Dental Research**, v.87, n.5, p. 414-3, May 2008.
- WITTKÉ-THOMPSON, J.K.; PLUZHNIKOV, A.; COX, N.J. Rational inferences about departures from Hardy-Weinberg equilibrium. **American Journal of Human Genetics**. 2005 Jun;v.76, n.6, p.967-86. Jun 2005.
- WRIGHT, L.M. et al. Stromal cell-derived factor-1 binding to its chemokine receptor CXCR4 on precursor cells promotes the chemotactic recruitment, development and survival of human osteoclasts. **Bone**, v.36, n.5, p. 840-853, May 2005.
- WU, F.L. et al. Interleukin-1 β +3954 polymorphisms and risk of external apical root resorption in orthodontic treatment: A meta-analysis. **Genetics and Molecular Research**,v.12, n.4, p. 4678-4686, 2013
- WYNNE, F. et al. Investigation of the genetic influence of the OPG, VDR (Fok1), and COLIA1 Sp1 polymorphisms on BMD in the Irish population. **Calcified Tissue International**, v.71.n.1, p. 26-35, July 2002.
- YAMAGUCHI, M. RANK/RANKL/OPG during orthodontic tooth movement. **Orthodontic and Craniofacial Research**, v.12, n.2, p. 113-119, May 2009.
- YANO, S. et al. Functional expression of beta-chemokine receptors in osteoblasts: role of regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in osteoblasts and regulation of its secretion by osteoblasts and osteoclasts. **Endocrinology**,v.146, n.5, p. 2324-2335, May 2005.
- YANPSET,K.;TROPE,M. Pulp revascularization of replanted immature dog teeth after different treatment methods. **Endodontics Dental Traumatology**,v.16, n.5, p. 211-217, Oct. 2000.
- YU, H-P.et al. DNA repair gene XRCC1 polymorphisms, smoking, and esophageal cancer risk. **Cancer Detection and Prevention**, v.28, n.3, p. 194-199, 2004.
- ZHANG, D. 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, June 2003.
- ZHANG, J. et al. The -1082A/G polymorphism in the Interleukin-10 gene and the risk of rheumatoid arthritis: A meta-analysis. **Cytokine**, v.56, n.2, p. 351-355, Nov. 2011.
- ZHANG, X.; PENG, B. Immunolocalization of receptor activator of NF kappa B ligand in rat periapical lesions. **Journal of Endodontics**, v.31, n.8, p. 574-577, Aug. 2005.
- ZHAO, H. et al. The influence of Lys3Asn polymorphism in the Osteoprotegerin gene on bone mineral density in Chinese postmenopausal women. **Osteoporosis International**, v.16, n.12, p. 1519-1524, Dec. 2005.
- ZHOU, P. et al. Current evidence on the relationship between four polymorphisms in the matrix metalloproteinases (MMP) gene and breast cancer risk: a meta-analysis. **Breast Cancer Res Treat**, v. 127, n.3, p. 813-8 Jun, 2011.
- ZHU, J. et al. EGF-like ligands stimulate osteoclastogenesis by regulating expression of osteoclast regulatory factors by osteoblasts: implications for osteolytic bone metastases. **Journal of Biological Chemistry**, v.282, n.37, p. 26656-64. Sep.2007.
- ZOU, G.Y.; DONNER, A. The Merits of Testing Hardy-Weinberg Equilibrium in the Analysis of Unmatched Case-Control Data: A Cautionary Note. **Annals of Human Genetics**, v.70, n.Pt 6, p. 923-933, Nov. 2006.
- ZUPAN, J.; JERAS, M.; MARC, J. Osteoimmunology and the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts. **Biochemical Medicine**, Zagreb, v.23, n.1, p. 43-63, 2013.

ANEXO A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, CONFORME O ITEM IV DA RESOLUÇÃO 196/96 DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE – Pacientes entre 13 e 18 anos

Projeto de Pesquisa: Estudo da expressão de citocinas e associação da ocorrência de seus polimorfismos com reabsorções radiculares externas inflamatórias e por substituição pós-trauma

Eu, Profa. Juliana Vilela Bastos, estou fazendo uma pesquisa para estudar os fatores que interferem na permanência de dentes avulsionados (dentes que saíram inteiros por causa de uma pancada, queda, colisão) que são recolocados no lugar. Uma das complicações mais frequentes após o reimplante é a reabsorção da raiz dentária pelo próprio organismo podendo levar à perda do dente. O objetivo deste trabalho é aumentar os conhecimentos a respeito das substâncias produzidas pelo seu próprio organismo que podem aumentar ou diminuir o risco de desenvolver estas reabsorções radiculares. Para estudarmos as substâncias produzidas pelo seu organismo precisamos coletar um pouco de seu sangue e da sua saliva (raspar sua bochecha). Além disso, se o seu dente tiver que ser extraído precisamos coletar material da raiz. Todos estes procedimentos serão realizados com a maior segurança, por profissionais capacitados e de acordo com normas técnicas e de biossegurança adequadas. Dor leve na retirada de sangue devido à punção com agulha pode ocorrer. Em casos raros a retirada de sangue se acompanha de sangramento ou manchas na pele. Os resultados da pesquisa serão sigilosos e divulgados, apenas, em revistas e encontros científicos e os pacientes não serão identificados.

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 for de sua livre vontade e 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.

Você dispõe de total liberdade para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir durante o andamento da pesquisa diretamente com a Profa. Juliana Vilela Bastos através dos telefones 31 3409 2454, 31 9978 6430, ou no Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP situado no Campus Pampulha da UFMG, na Unidade Administrativa II (prédio da Fundep), 2º andar, sala 2005. O número de telefone é: 31 3409-4592.

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO;

Declaro que fui suficientemente informado(a) a respeito da pesquisa a respeito dos fatores determinantes da evolução de reimplantes dentários após avulsões traumáticas e que concordo em participar desta investigação. Declaro ainda que não recebi qualquer tipo de pressão para participar, que não receberei qualquer pagamento e que não sou responsável por nenhum tipo de despesa relacionada ao desenvolvimento desse trabalho. Estou ciente de que tenho a liberdade de desistir, a qualquer momento, sem necessidade de justificativa, de colaborar voluntariamente com a pesquisa em curso.

Nome do paciente

Assinatura do paciente

Belo Horizonte, de

de 20__ .

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, CONFORME O ITEM IV DA RESOLUÇÃO 196/96 DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE – Pais de pacientes entre 13 e 18 anos

Projeto de Pesquisa: Estudo da expressão de citocinas e associação da ocorrência de seus polimorfismos com reabsorções radiculares externas inflamatórias e por substituição pós-trauma

Eu, Profa. Juliana Vilela Bastos, estou fazendo uma pesquisa para estudar os fatores que interferem na permanência de dentes avulsionados (dentes que saíram inteiros por causa de uma pancada, queda, colisão) que são recolocados no lugar. Uma das complicações mais frequentes após o reimplante é a reabsorção da raiz dentária pelo próprio organismo podendo levar à perda do dente. O objetivo deste trabalho é aumentar os conhecimentos a respeito das substâncias produzidas pelo próprio organismo que podem aumentar ou diminuir o risco de desenvolver estas reabsorções radiculares. Para realizarmos este estudo precisamos coletar um pouco de sangue e de saliva (raspar a bochecha). Além disso, precisamos coletar material da raiz dos dentes indicados para extração. Todos estes procedimentos serão realizados com a maior segurança, por profissionais capacitados e de acordo com normas técnicas e de biossegurança adequadas e não causarão lesões ou desconforto ao paciente. Dor leve na retirada de sangue devido à punção com agulha pode ocorrer. Em casos raros a retirada de sangue se acompanha de sangramento ou manchas na pele. Os resultados da pesquisa serão sigilosos e divulgados, apenas, em revistas e encontros científicos e os pacientes não serão identificados.

A participação neste estudo não é condição necessária para que seu filho continue sendo atendido na Clínica de Traumatismo Dentário da Faculdade de Odontologia da UFMG. Ele só participará deste trabalho se ele e seu responsável voluntariamente concordarem e assinarem o termo de consentimento. Também poderão desistir da participação nesta pesquisa a qualquer tempo 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. Você dispõe de total liberdade para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir durante o andamento da pesquisa diretamente com a Profa. Juliana Vilela Bastos através dos telefones 31 3409 2454, 31 9978 6430, ou no Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP situado no Campus Pampulha da UFMG, na Unidade Administrativa II (prédio da Fundep), 2º andar, sala 2005. O número de telefone é: 31 3409-4592.

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO;

Declaro que fui suficientemente informado(a) a respeito da pesquisa a respeito dos fatores determinantes da evolução de reimplantes dentários após avulsões traumáticas e que autorizo a participação de

_____ *neste estudo. Declaro ainda que não recebi qualquer tipo de pressão para participar, que não receberei qualquer pagamento e que não sou responsável por nenhum tipo de despesa relacionada ao desenvolvimento desse trabalho. Estou ciente de que tenho a liberdade de desistir, a qualquer momento, sem necessidade de justificativa, de colaborar voluntariamente com a pesquisa em curso.*

Nome do responsável

Assinatura do responsável

Belo Horizonte, de _____ de 20__ .

ANEXO C-TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, CONFORME O ITEM IV DA RESOLUÇÃO 196/96 DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE – Pacientes maiores de 18 anos

Projeto de Pesquisa: Estudo da expressão de citocinas e associação da ocorrência de seus polimorfismos com reabsorções radiculares externas inflamatórias e por substituição pós-trauma

Eu, Profa. Juliana Vilela Bastos, estou fazendo uma pesquisa para estudar os fatores que interferem na permanência de dentes avulsionados (dentes que saíram inteiros por causa de uma pancada, queda, colisão) que são recolocados no lugar. Uma das complicações mais frequentes após o reimplante é a reabsorção da raiz dentária pelo próprio organismo podendo levar à perda do dente. O objetivo deste trabalho é aumentar os conhecimentos a respeito das substâncias produzidas pelo seu próprio organismo que podem aumentar ou diminuir o risco de desenvolver estas reabsorções radiculares. Para estudarmos as substâncias produzidas pelo seu organismo precisamos coletar um pouco de seu sangue e da sua saliva (raspar sua bochecha). Além disso, se o seu dente tiver que ser extraído precisamos coletar material da raiz. Todos estes procedimentos serão realizados com a maior segurança, por profissionais capacitados e de acordo com normas técnicas e de biossegurança adequadas. Dor leve na retirada de sangue devido à punção com agulha pode ocorrer. Em casos raros a retirada de sangue se acompanha de sangramento ou manchas na pele. Os resultados da pesquisa serão sigilosos e divulgados, apenas, em revistas e encontros científicos e os pacientes não serão identificados.

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 for de sua livre vontade e 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.

Você dispõe de total liberdade para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir durante o andamento da pesquisa diretamente com a Profa. Juliana Vilela Bastos através dos telefones 31 3409 2454, 31 9978 6430, ou no Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP situado no Campus Pampulha da UFMG, na Unidade Administrativa II (prédio da Fundep), 2º andar, sala 2005. O número de telefone é: 31 3409-4592.

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO;

Declaro que fui suficientemente informado(a) a respeito da pesquisa a respeito dos fatores determinantes da evolução de reimplantes dentários após avulsões traumáticas e que concordo em participar desta investigação. Declaro ainda que não recebi qualquer tipo de pressão para participar, que não receberei qualquer pagamento e que não sou responsável por nenhum tipo de despesa relacionada ao desenvolvimento desse trabalho. Estou ciente de que tenho a liberdade de desistir, a qualquer momento, sem necessidade de justificativa, de colaborar voluntariamente com a pesquisa em curso.

Nome do paciente

Assinatura do paciente

Belo Horizonte, de _____ de 20__ .

ANEXO D - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, CONFORME O ITEM IV DA RESOLUÇÃO 196/96 DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE – Pais de pacientes entre 07 e 12 anos

Projeto de Pesquisa: Estudo da expressão de citocinas e associação da ocorrência de seus polimorfismos com reabsorções radiculares externas inflamatórias e por substituição pós-trauma

Eu, Profa. Juliana Vilela Bastos, estou fazendo uma pesquisa para estudar os fatores que interferem na permanência de dentes avulsionados (dentes que saíram inteiros por causa de uma pancada, queda, colisão) que são recolocados no lugar. Uma das complicações mais frequentes após o reimplante é a reabsorção da raiz dentária pelo próprio organismo podendo levar à perda do dente. O objetivo deste trabalho é aumentar os conhecimentos a respeito das substâncias produzidas pelo próprio organismo que podem aumentar ou diminuir o risco de desenvolver estas reabsorções radiculares. Para realizarmos este estudo precisamos coletar um pouco de sangue e de saliva (raspar a bochecha). Além disso, precisamos coletar material da raiz dos dentes indicados para extração. Todos estes procedimentos serão realizados com a maior segurança, por profissionais capacitados e de acordo com normas técnicas e de biossegurança adequadas e não causarão lesões ou desconforto ao paciente. Dor leve na retirada de sangue devido à punção com agulha pode ocorrer. Em casos raros a retirada de sangue se acompanha de sangramento ou manchas na pele. Os resultados da pesquisa serão sigilosos e divulgados, apenas, em revistas e encontros científicos e os pacientes não serão identificados.

A participação neste estudo não é condição necessária para que seu filho continue sendo atendido na Clínica de Traumatismo Dentário da Faculdade de Odontologia da UFMG. Ele só participará deste trabalho se ele e seu responsável voluntariamente concordarem e assinarem o termo de consentimento. Também poderão desistir da participação nesta pesquisa a qualquer tempo 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. Você dispõe de total liberdade para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir durante o andamento da pesquisa diretamente com a Profa. Juliana Vilela Bastos através dos telefones 31 3409 2454, 31 9978 6430, ou no Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP situado no Campus Pampulha da UFMG, na Unidade Administrativa II (prédio da Fundep), 2º andar, sala 2005. O número de telefone é: 31 3409-4592.

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO;

Declaro que fui suficientemente informado(a) a respeito da pesquisa a respeito dos fatores determinantes da evolução de reimplantes dentários após avulsões traumáticas e que autorizo a participação de _____ neste estudo. Declaro ainda que não recebi qualquer tipo de pressão para participar, que não receberei qualquer pagamento e que não sou responsável por nenhum tipo de despesa relacionada ao desenvolvimento desse trabalho. Estou ciente de que tenho a liberdade de desistir, a qualquer momento, sem necessidade de justificativa, de colaborar voluntariamente com a pesquisa em curso.

Nome do paciente

Assinatura do paciente

Nome do responsável

Assinatura do responsável

Belo Horizonte, de _____ de 20__ .

ANEXO E- Parecer do COEP – UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 0003.0.203.000-11

Interessado(a): **Profa. Juliana Vilela Bastos**
Departamento de Odontologia Restauradora
Faculdade de Odontologia - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 26 de maio de 2011, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Estudo da expressão de citocinas e associação da ocorrência de seus polimorfismos com reabsorções radiculares externas inflamatórias e por substituição pós-trauma"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

Age and Timing of Pulp Extirpation as Major Factors Associated with Inflammatory Root Resorption in Replanted Permanent Teeth

Juliana Vilela Bastos, DDS, MSc,* Maria Ilma de Souza Côrtes, DDS, PhD,*
Eugenio Marcos Andrade Goulart, PhD,[†] Enrico Antonio Colosimo, PhD,[‡]
Ricardo Santiago Gomez, DDS, PhD,[§] and Walderez Ornelas Dutra, PhD||

Abstract

Introduction: External root resorption (ERR) is a serious complication after replantation, and its progressive inflammatory and replacement forms are significant causes of tooth loss. This retrospective study aimed to evaluate the factors related to the occurrence of inflammatory ERR (IERR) and replacement ERR (RERR) shortly after permanent tooth replantation in patients treated at the Dental Trauma Clinic at the School of Dentistry, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. **Methods:** Case records and radiographs of 165 patients were evaluated for the presence, type, and extension of ERR and its association with age and factors related to the management and acute treatment of the avulsed tooth by using the logistic regression model. **Results:** The patient's age at the moment of trauma had a marked effect on the ERR prevalence and extension. The patients older than 16 years at the moment of trauma had less chance of developing IERR and RERR (77% and 87%, respectively) before the pulp extirpation, regardless of the extension of the resorption. The patients older than 11 years of age at the moment of trauma showed the lowest indices of IERR ($P = .02$). Each day that elapsed between the replantation and the pulp extirpation increased the risk of developing IERR and RERR by 1.2% and 1.1%, respectively, and also raised the risk of severe IERR by 0.5% per day. **Conclusions:** The risk of mature teeth developing severe IERR before the onset of endodontic therapy was directly affected by the timing of the pulpectomy and was inversely proportional to age. Systemic antibiotic therapy use had no effect on the occurrence and severity of IERR in mature teeth. The occurrence of RERR before the onset of endodontic treatment stimulates

further investigations of the early human host response to trauma and subsequent infection. (*J Endod* 2013; ■:1–6)

Key Words

External inflammatory root resorption, external replacement root resorption, tooth avulsion, tooth replantation, traumatic injuries

After replantation, external root resorption (ERR) is a possible serious outcome that commonly results in tooth loss. In advanced stages of the inflammatory and replacement progressive forms of ERR, the weakened root walls become unable to endure even functional forces, thereby leading to the exfoliation of the tooth or to cervical root fracture (1). Replacement ERR (RERR) is related to the absence of vital periodontal ligament (PL) cells in the root surface, which results in tooth fusion to the alveolar bone. The damaged PL is repopulated by the adjacent bone marrow cells, followed by gradual replacement of the tooth structure by bone, a progressive condition that may lead to tooth loss because there is no effective treatment (1–4). Inflammatory ERR (IERR) is characterized by areas of erosion on the cementum and dentin, with numerous Howship lacunae, odontoclasts, and regions of inflammatory infiltration in the adjacent periodontal tissue (1, 4–6). The onset of IERR results from mechanical damage to the PL and to the root surface at the time of injury and the presence of necrotic and infected pulp. Immediately after replantation, healing events are initiated to repair the damaged areas. This process exposes dentinal tubules and allows for the passage of bacteria and their toxic products from the root canal to the lateral PL intensifying the resorption that advances toward the root canal (7–9).

Many clinical studies concerning the fate of replanted teeth have examined the prevalence of ERR and their determinants (10–23). There is clinical evidence that younger patients and earlier stages of root development are associated with a greater risk for ERR (10–12) and its faster progression (13). Furthermore, several factors related to the immediate care and treatment of the avulsed tooth may affect the outcome of replantation. The lack of a sustaining metabolic medium during the extra-alveolar period seems to be crucial for triggering ERR and its progression (10, 13–22). The presence of visible contamination (18, 20) and additional crown fracture have been

From the *Dental Trauma Program, Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte; [†]Department of Pediatrics, School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte; [‡]Department of Statistics, Institute of Exact Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte; [§]Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte; and ||Laboratory of Cell-Cell Interactions, Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Supported by grants from PROEX-UFMG and PRPq-UFMG.

Address requests for reprints to Prof Juliana Vilela Bastos, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Campus Pampulha Av. Presidente Antônio Carlos 6627, CEP 31270901, Belo Horizonte, MG, Brazil. E-mail address: jvb@ufmg.br; julianavb7@yahoo.com.br

0099-2399/\$ - see front matter

Copyright © 2013 American Association of Endodontists.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2013.10.009>

Clinical Research

associated with ERR after replantation (20). In terms of the treatment-related factors, delaying pulp extirpation after the replantation (21–24), using systemic antibiotic therapy (SAT) (25), and splinting type and time have also been associated with ERR (18, 26). Only a few of the aforementioned studies have approached the specific determinants of the 2 types of ERR separately soon after replantation (17, 19, 20). Because the disease processes and clinical features of IERR and RERR are so diverse, it is reasonable to surmise that various risk factors may act at different times after replantation and influence the specific patterns of ERR. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the role of age and other factors related to the management and acute treatment on the occurrence of IERR and RERR shortly after replantation of avulsed permanent mature teeth in patients treated at the Dental Trauma Clinic, School of Dentistry, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

Materials and Methods

Study Population and Teeth

Case records and radiographs of replanted teeth from patients who were admitted to the Dental Trauma Clinic at the School of Dentistry of Federal University of Minas Gerais from 1994–2011 were analyzed to collect retrospective data regarding the patient's age at the time of trauma, root development stage, extra-alveolar period and storage condition of the avulsed teeth, splinting period and type, pulpectomy timing, and SAT use. The patients received acute treatment at the Emergency Dental Service of Municipal Hospital Odilon Behrens and were referred to the Dental Trauma Clinic at the School of Dentistry of Federal University of Minas Gerais to proceed with treatment. The time elapsed between the trauma and the acute treatment ranged from 4 hours to 3 days. The replantation was performed according to the protocol adopted by the Dental Trauma Clinic at the School of Dentistry of Federal University of Minas Gerais since 1994, which was based upon information from the literature (27). The avulsed teeth were held by the crown and rinsed with a physiological salt solution. Saline irrigation was used to remove the intra-alveolar clot. No root surface treatment was performed. After the correct repositioning was radiographically verified, the tooth was splinted with a double-ligature wire (0.08 inches), slightly twisted and fixed with composite resin. Only teeth with closed apices were included in this study. Teeth with additional traumatic injuries and those with extensive restoration, endodontic treatment, or radiographic signs of root resorption before the injury were excluded. Patients with history of previous trauma were not included. Study approval was obtained from the Human Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais (COEP-UFGM - 003.0.203.000-11).

Radiographic Assessment of Root Resorption

Periapical radiographs, which were taken immediately after replantation and at the time of pulpectomy, were independently examined by 2 authors (J.V.B. and M.J.S.C.). Each radiograph was labeled with a number to ensure that the analyses were performed blindly. Radiographic standardization was based on established criteria (28). Occlusal and periapical radiographs were taken immediately after replantation and at the onset of the endodontic therapy. The occlusal radiographs were performed by using the bisecting angle technique with large film (Kodak Ultra-speed, size 4; Eastman Kodak Company, Rochester, NY) and directing the central beam between the 2 central incisors. The periapical radiographs were taken by using the paralleling technique with small film (Kodak Ultra-speed DF 58, size 2; Eastman Kodak Company) and film holders with a fixed object-focus distance of 33 cm (Cone; Maquira Dental Products, Maringá, PR, Brazil). The orientation of the central beam was directed between

the 2 central incisors, between the right or left lateral and the central incisors or canines, depending on the traumatized teeth. All radiographs were taken at 70 kVp, 8 mA (Spectro 70X Eletronic Dabi Atlante S/A; Medical & Dental Industry, Ribeirão Preto, SP, Brazil). Data regarding the presence and amount of ERR were assessed by using the root resorption index developed by Andersson et al (13). The structures in the resorption cavities were classified as either inflammatory resorption (bowl-shaped radiolucencies in the resorption area) or as replacement resorption (bone structures in the resorption area and periodontal space loss) (11).

Statistical Procedures

The statistical analysis was performed by using SPSS 17 software (SPSS Inc, Chicago IL). A logistic regression model was used to test the association between the patient's age, extra-alveolar period and storage, SAT use, and the pulpectomy and splinting timing in relation to ERR at the onset of endodontic therapy. Variables that presented *P* values < .25 in the univariate analysis were tested in the multivariate model (29). The level of significance was set at *P* < .05.

Results

Patients and Teeth

The sample consisted of 165 patients, 122 male (74.5%) and 43 female (25.5%), with 205 teeth replanted after avulsion. Patient's age at the time of injury ranged from 7.9–33.1 years (mean, 12.7 ± 3.8 years). Considering the potential interdependence in cases in which more than 1 tooth was replanted in the same patient, 1 tooth was randomly selected from each patient to avoid any possible bias (30). The tooth group distribution was as follows: 139 maxillary central incisors (84.2%), 17 maxillary lateral incisors (10.3%), 3 mandibular incisors (1.8%), and 9 canines (3.6%).

Extra-alveolar Conditions

The median extra-alveolar period of the avulsed teeth was 120 minutes and ranged from 5 minutes–3 days. The sample distribution according to the extra-alveolar period and storage condition is shown in Table 1. The teeth that were kept dry for more than 20 minutes before storage in a wet medium were classified within the dry environment group. This criterion was based on previous results showing that a combination of dry and wet storage resulted in a significantly lower healing rate among teeth kept dry for 20 minutes or more before storage in a wet medium (15).

Factors Related to Acute Treatment

Splinting times ranged from 7 days to 24.6 months, with a median time of 49 days. Time elapsed from replantation until pulp extirpation ranged from 6 hours to 39.6 months, with a median time of 2.2 months. Systemic therapy with an oxycillin was prescribed in 32.8% of the cases.

Root Resorption Activity

Radiographic signs of ERR were found in 77.6% of the cases, and 37 teeth (22.4%) showed no ERR. Regarding the ERR type, 64.3% of the teeth showed IERR, and 13.3% showed RERR. The ERR indices ranged from 0–12 and were grouped into 2 categories, low (≤ 4) and severe (> 4), which represented 73.3% and 26.7% of the cases, respectively. The kappa scores indicated excellent intraexaminer agreement for both examiners (0.85% and 0.82%) and fair to good interexaminer agreement (0.75%).

The patient's age, extra-alveolar period and storage, SAT use, and pulpectomy and splinting timing were individually tested in relation to

Clinical Research

TABLE 3. Logistic Regression Model: Univariate and Multivariate Analysis of Relationship between Age, Treatment-related Factors, and Extension of ERR before Pulp Extirpation

Prognostic factor	Index of ERR $\leq 4 \times$ Index of ERR > 4							
	IERR + RERR (n = 160)				IERR (n = 137)			
	Univariate analysis		Multivariate analysis		Univariate analysis		Multivariate analysis	
	OR (95% CI)	P value	OR (95% CI)	P value	OR (95% CI)	P value	OR (95% CI)	P value
Age at trauma								
>11 y	0.42 (0.20–0.89)	.02*	0.40 (0.18–0.86)	.02*	0.41 (0.18–0.92)	.03*	0.36 (0.15–0.85)	.02*
>16 y	0.14 (0.02–1.11)	.06 [†]	0.13 (0.02–1.08)	.06 [†]	0.16 (0.02–1.23)	.08 [†]	0.16 (0.02–1.44)	.10 [†]
Extra-alveolar period								
>15 min	1.62 (0.31–8.36)	.57			1.63 (0.30–8.80)	.57		
Storage media								
Water, saline, saliva	0.80 (0.35–1.81)	.59	—		0.91 (0.37–2.20)	.83		
Milk	0.73 (0.27–2.00)	.54			0.65 (0.23–1.84)	.42		
Systemic antibiotic therapy								
No	0.35 (0.09–1.35)	.13*	0.29 (0.06–1.37)	.12*	0.60 (0.14–2.51)	.48		
Timing of pulp extirpation								
Each additional day	1.003 (1.001–1.006)	.006*	1.003 (1.001–1.006)	.005*	1.005 (1.001–1.008)	.004*	1.005 (1.002–1.008)	.003*
Splinting time								
Each additional day	1.006 (1.002–1.010)	.003*	1.000 (0.993–1.007)	.99*	1.008 (1.003–1.013)	.003*	1.003 (0.989–1.009)	.81*

CI, confidence interval; OR, odds ratio.

*Model 1 for multivariate analyses considering the cutoff point of 11 years.

[†]Model 2 for multivariate analyses considering the cutoff point of 16 years.

initial IERR were mainly affected by the timing of the pulpectomy in a progressive manner (ie, each day that passed from the moment of replantation until the time of pulp extirpation increased both the risk of developing IERR and its severity). Although delayed pulp extirpation had already been associated with a higher frequency of IERR (17, 23), the progressive effect found in the present study had not been previously reported. On the contrary, previous studies have shown that the timing of the pulpectomy was not critical within 20 days (17). A recent meta-analysis also suggested that delaying pulp extirpation beyond 14 days significantly increased the risk of developing IERR, but this effect was not observed at the 10-day cutoff point (24). In the present sample, the acute treatment was performed in another center, and the patients were then instructed to seek treatment at the Dental Trauma Clinic, School of Dentistry, Federal University of Minas Gerais, leading to a great variation in the time of the pulpectomy. This enabled the testing of several cutoff points and their relationships with the resorption risk. Delayed pulpectomy also affected the extension of IERR. This result can be explained by the fact that similar to endodontic infections in nontraumatized teeth, bacteria present in the root canal are inaccessible to the immune response, and unless the infection is mechanically removed by endodontic therapy, a persistent inflammatory response is maintained at the root surface. This host response plays a critical and protective role in resisting infection but also has destructive consequences (32).

The present study demonstrated that patient's age at the moment of trauma had an important role in the risk of developing ERR and in its severity. Although this association has been previously reported (10–13), the fact that only teeth with closed apices were included in the present sample implies that age may affect root resorption through mechanisms other than the known effect of the stage of root development. The data revealed a lower prevalence of IERR in patients older than 16 years at the moment of trauma. Interestingly, when considering the extension of IERR, the effect of age was not observed at the cutoff point of 16 years, but instead it was observed at the age of 11 years. Regardless of the differences in the evaluated outcomes, the present results align with the previous reports from Andersson et al (13), who observed lower RERR rates in adult patients

(older than 16 years), and from Barrett and Kenny (16), who observed a trend toward the improved survival of replanted incisors in children older than 11 years at the time of replantation. Therefore, it can be speculated that the protective effect of age observed in patients older than 16 years can also be attributed to lower bone turnover, similar to its effect on RERR, which was discussed by Andersson et al (14). The higher extension of IERR found in patients younger than 11 years of age could, however, be explained by the fact that young teeth still have wide dentinal tubules, even with closed apices. This feature allows the irritants to move freely and quickly from the root canal space to the external root surface, resulting in faster and more extensive IERR (4, 8, 9).

Many studies have shown the effect of the extra-alveolar period and storage conditions in the occurrence of IERR soon after replantation (17, 19, 20) and in the long-term (12, 14, 15, 18, 21–23). In the present sample, these factors were not associated with the prevalence or extension of ERR. It should be noted that for the majority of cases kept dry in our sample (Table 1), the extra-alveolar period surpassed the critical limit of 15 minutes that was described in the literature (14, 20). This fact was also true for the teeth stored in saline and tap water because most of them exceeded the critical limit of a 20-minute storage period (15). The relatively small number of cases replanted in the recommended time in these groups might have impaired more reliable comparisons. Teeth stored in saliva and milk were replanted in a suitable time in 50% and 93.9% of the cases, respectively (Table 1). Despite this fact, the present results differ from the experimental and clinical data reporting low frequencies of IERR after replantation of teeth stored in saliva for up to 20 minutes (15) and in milk for up to 6 hours (33, 34). The delayed pulpectomy observed in the present sample could be the reason for such a discrepancy. The prolonged exposure of the damaged PL to bacteria and their by-products might have overcome the favorable extra-alveolar period in saliva and milk, because it is well known that infection may protract or even prevent healing (32).

The effect of splinting time on the prevalence and severity of IERR observed in the univariate analysis (Tables 2 and 3) could not be confirmed after correction in the multivariate model. It appears that the association observed in the individual analysis resulted from bias with the pulpectomy timing, because they were quite similar. The

present results are in agreement with a previous report showing that IERR was not affected by the splinting time (18).

SAT had no effect on the risk of developing IERR or on its severity. Current guidelines recommend SAT to reduce the likelihood of developing inflammatory resorption, particularly in cases of delayed pulpectomy (35). Although the advantages of SAT have been demonstrated experimentally (36, 37), previous clinical data have not found improved long-term periodontal outcomes (10, 15, 16), and the results of a recent meta-analysis have shown that the benefits of SAT were inconclusive (25). Likewise, in the present study, systemic amoxicillin use had no effect on the prevalence or the severity of IERR observed before the pulpectomy. These results are consistent with the fact that infection inside the root canal, which is ultimately responsible for the triggering of IERR and its progression, is not accessible to oral antibiotics because there are no viable blood vessels in the necrotic pulp.

An intriguing finding in the present study was the occurrence of 13.3% of RERR before the onset of endodontic treatment. This result could be attributed to the technical difficulties in diagnosing the initial superimposed resorption cavities located on the buccal and lingual root surfaces (14, 38). This possibility was minimized by taking radiographs at different angles, following standardized criteria (28). Another possibility is that these results truly reflect differences in the response to trauma and subsequent infection. The latter hypothesis is supported by recent clinical data that demonstrated the importance of a predominantly Th2 immunological profile in successful replantation despite differences in the post-trauma management of the avulsed tooth (39, 40). Indeed, the present results indicated that neither age nor any of the clinical factors could be associated with the type of ERR when the IERR and RERR cases were compared. It appears from the present analysis that the patient's age and the timing of pulpectomy were associated with the development of ERR, irrespective of type. However, the reason why some cases developed RERR before pulp extirpation remains unknown. The bacteriologic etiology for IERR has been established experimentally (7, 8) and reaffirmed clinically (10, 15, 17, 21–23). Likewise, it is well-established that the absence of a vital PL on the root surface leads to progressive RERR (2, 3, 9). However, the counterpart of the host response, which may provide a pathobiological basis for better understanding the different outcomes observed after replantation, remains underexplored and stimulates further investigation, as does the subject of the microbiota of traumatized teeth.

In conclusion, the present results revealed that the risk of developing severe IERR shortly after trauma in mature teeth was inversely proportional to patient's age at the moment of trauma. In addition, the time elapsed between replantation and the onset of endodontic therapy progressively affected the prevalence and severity of IERR. The use of SAT, splinting time, and extra-alveolar period and storage had no effect on ERR observed at the time of the pulpectomy in mature teeth. Additional investigations focusing on the early human host response to trauma and subsequent infection may add relevant information to this area.

Acknowledgments

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

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. Analysis of pathogenesis and topography of replacement root resorption (ankylosis) after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Swed Dent J* 1980;4:231–40.
- Hammarström L, Blomlöf L, Lindskog S. Dynamics of dentoalveolar ankylosis and associated root resorption. *Endod Dent Traumatol* 1989;5:163–75.
- Andreasen JO, Hjørting-Hansen E. Replantation of teeth: II—histological study of 22 replanted anterior teeth in humans. *Acta Odontol Scand* 1966;24:287–306.
- Andreasen JO. Analysis of topography of surface and inflammatory root resorption after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Swed Dent J* 1980;4:135–44.
- Günday M, Sazak H, Türkmen C. A scanning electron microscopic study of external root resorption in replanted dog teeth. *J Endod* 1995;21:269–71.
- Andreasen JO. Relationship between surface and inflammatory resorption and changes in the pulp after replantation of permanent incisors in monkeys. *J Endod* 1981;7:294–301.
- Andreasen JO. The effect of pulp extirpation or root canal treatment on periodontal healing after replantation of permanent incisors in monkeys. *J Endod* 1981;7:245–52.
- Hammarström L, Lindskog S. Factors regulating and modifying root resorption. *Proc Finn Dent Soc* 1992;88(Suppl 1):115–23.
- 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;24:263–86.
- Andreasen JO, Borum M, Jacobsen H, Andreasen F. Replantation of 400 avulsed permanent incisors: 1—diagnosis of healing complications. *Endod Dent Traumatol* 1995;11:51–8.
- Petrovic B, Marković D, Perić T, Blagojević D. Factors related to treatment and outcomes of avulsed teeth. *Dent Traumatol* 2010;26:52–9.
- 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.
- Andersson L, Bodin I. Avulsed human teeth replanted within 15 minutes: a long term clinical follow-up study. *Endod Dent Traumatol* 1990;6:37–42.
- Andreasen JO, Borum M, Jacobsen H, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors: 4—factors related to periodontal ligament healing. *Endod Dent Traumatol* 1995;11:76–89.
- Barrett EJ, Kenny DJ. Survival of avulsed permanent maxillary incisors in children following delayed replantation. *Endod Dent Traumatol* 1997;13:269–75.
- 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;15:269–72.
- Kinirons MJ, Gregg TA, Welbury RR, Cole BOI. Variations in the presenting and treatment features in reimplanted permanent incisors in children and their effect on the prevalence of root resorption. *Br Dent J* 2000;189:263–6.
- Boyd DH, Kinirons MJ, Gregg TA. A prospective study of factors affecting survival of replanted permanent incisors in children. *Int J Paed Dent* 2000;10:200–5.
- Donaldson M, Kinirons MJ. Factors affecting the time and onset of resorption in avulsed and replanted incisor in children. *Dent Traumatol* 2001;17:205–9.
- Chappuis V, von Arx T. Replantation of 45 avulsed permanent teeth: a 1-year follow-up study. *Dent Traumatol* 2005;21:289–96.
- Weder 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;121:312–20.
- Coccia CT. A clinical investigation of root resorption rates in reimplanted young permanent incisors: a five-year study. *J Endod* 1980;6:413–20.
- 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;25:32–42.
- 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;25:158–64.
- Hinckfuss SE, Messer LB. Splinting duration and periodontal outcomes for replanted avulsed teeth: a systematic review. *Dent Traumatol* 2009;25:150–7.
- Andreasen JO, Andreasen FM. Avulsions. In: Andreasen JO, Andreasen FM, eds. *Text Book and Color Atlas of Traumatic Injuries to the Teeth*, 3rd ed. Copenhagen: Munksgaard; 1994:383–420.
- Andreasen FM, Andreasen JO. Diagnosis of luxation injuries: the importance of standardized clinical, radiographic and photographic techniques in clinical investigation. *Endod Dent Traumatol* 1985;1:160–9.
- Mickey RM, Greenland S. The impact of confounder selection criteria on effect estimation. *Am J Epidemiol* 1989;129:125–37.
- Diggle P, Hegerly P, Liang K, Zeger S. Analysis of longitudinal data. *Oxford Statistical Science Series*, 2nd ed. Oxford, UK: Oxford University Press; 2002.
- Nguyen P-MT, Kenny DJ, Barret DJ. Socio-economic burden of permanent incisor replantation on children and parents. *Dent Traumatol* 2004;20:123–33.

Clinical Research

32. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol* 2011;17:3.
33. Blomlöf L, Lindskog S, Hammarström L. Periodontal healing of exarticulated monkey teeth stored in milk or saliva. *Scand J Dent Res* 1981;89:251–9.
34. Blomlöf L, Lindskog S, Andersson L, et al. Storage of experimentally avulsed teeth in milk prior to replantation. *J Dent Res* 1983;62:912–6.
35. 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;28:88–96.
36. Hammarström L, Blomlöf L, Feiglin B, et al. Replantation of teeth and antibiotic treatment. *Endod Dent Traumatol* 1986;2:51–7.
37. 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.
38. Andreasen FM, Sewerin I, Mandel U, Andreasen JO. Radiographic assessment of simulated root resorption cavities. *Endod Dent Traumatol* 1987;3:21–7.
39. Rosakamp L, Westphalen VPD, Lima JHC, et al. The influence of atopy in the prognosis of the replantation of avulsed teeth. *J Periodontol* 2009;80:1121–4.
40. Rosakamp L, Westphalen VPD, Carneiro E, et al. The positive influence of atopy on the prognosis of avulsed and replanted teeth despite differences in post-trauma management. *J Endod* 2011;37:463–5.

ANEXO G- Manuscrito submetido no IEJ: **A study of the interleukin-1 gene cluster polymorphisms and inflammatory external root resorption in replanted permanent teeth**

Abstract

Aim To investigate whether single nucleotide polymorphisms (SNPs) within the interleukin-1 gene cluster (*IL1*) are associated with the occurrence and severity of inflammatory external root resorption (IERR) after replantation of avulsed permanent teeth.

Methodology Indexes of IERR were radiographically assessed in 182 mature replanted permanent teeth from 146 patients at the onset of endodontic therapy. DNA was extracted from buccal mucosa cells and genotyped using TaqMan probe-based assays for the SNPs *IL1A* -889C/T (rs 180058), *IL1B* +3954C/T (rs1143634) and *IL1RN* +2018C/T (rs419598). Teeth were grouped into two categories: IERR absent to mild (indexes ≤ 4) and moderate to severe IERR (indexes > 4). Genetic variations in the *IL1* gene cluster were tested for their effect on the occurrence and extension of IERR using the GEE model (Generalized Estimation Equation). Patient's age at the moment of injury, timing of pulpectomy, extra-alveolar period and storage condition of the avulsed teeth were included as possible confounders.

Results No association was found between SNPs *IL1A* -889C/T, *IL1B* +3954C/T (rs1143634) and *IL1RN* +2018C/T (rs419598) and IERR indexes. Timing of pulpectomy (OR 3.5 IC 95% 2.0-6.2 $p < 0.001$) and patient's age at the moment of trauma (OR 0.29 IC 95% 0.12-0.67 $p = 0.004$) significantly affected the risk of developing severe IERR.

Conclusions While timing of pulpectomy and patient's age at the moment of trauma were confirmed as important risk factors, SNPs within the *IL1* gene cluster did not affect the susceptibility for IERR after replantation of permanent teeth.

INTRODUCTION

One of the most serious complications in replanted permanent teeth is inflammatory external root resorption (IERR), a progressive process that may irreversibly damage the root structure leading to tooth loss (Cvek 1992). Progressive IERR is stimulated by pulp necrosis and infection of the root canal after a traumatic injury to the periodontal ligament (PL) and root surface. The role of endodontic infection in the IERR pathogenesis was observed experimentally (Andreasen 1981a, 1981b, Trope *et al.* 1992) and reaffirmed clinically, especially in cases of delayed pulpectomy (Coccia 1980, Hinckfuss & Messer 2009, Weder *et al.* 2011, Bastos *et al.* 2014). Patient's age at the moment of trauma also has been shown to be a decisive parameter for the risk of developing IERR (Andreasen *et al.* 1995a, Petrovic *et al.* 2009, Bastos *et al.* 2014). Furthermore, clinical data has demonstrated that atopic patients, who predominantly produce anti-inflammatory cytokines, had a more favorable outcome after replantation despite differences in post-trauma management of the avulsed tooth (Roskamp *et al.* 2011).

The interleukin-1 gene cluster (*IL1*) is located in the human chromosome 2 and contains genes coding for pro-inflammatory cytokines that include IL-1 α and IL-1 β , as well as the anti-inflammatory cytokine IL-1 receptor antagonist (IL-1RA). Although IL-1 α and IL-1 β are distinct gene products they recognize the same cell surface receptors and share a wide spectrum of biologic activities which regulate functions of the innate and adaptive immune response (Dinarello 1999). IL-1 is a potent stimulator of bone resorption acting directly in osteoclast differentiation and also indirectly due to its ability to stimulate the osteoclastogenic activity of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) and to increase prostaglandin synthesis in bone (Lorenzo *et al.* 2008). IL-1 has been shown to be a critical mediator involved in the induction of osteoclastogenic activity in periapical lesions and periodontitis (Graves *et al.* 2011), in the bone remodeling during orthodontic movement and tooth eruption (Wise & King 2008). Additionally, it is well established that IL-1 has an important role during physiologic root resorption in primary teeth (Harokopakis-Hajishengallis 2007) and during external apical root resorption (EARR) after orthodontic treatment (Hartsfield 2009). The interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA) is the natural competitive inhibitor of IL-1, occupying the cell surface IL-1 receptor without triggering signal transduction (Dinarello 1999, Arend 2002). The

balance between IL-1 and IL-1RA in local tissues plays an important role in the susceptibility to and severity of many diseases (Arend 2002).

Polymorphisms within the *IL1* gene cluster region can influence IL-1 and IL-1RA protein levels. The SNP -889C/T of the *IL1A* gene is located at position -889 in the 5'-flanking region and has been demonstrated to increase significantly the transcriptional activity of the *IL1A* gene and protein levels in the plasma (Dominici *et al.* 2002). Likewise, the allele T at +3954 position in the *IL1B* gene has been associated with increased IL-1 β production (Hummel & Santtila 1998, Iwasaki *et al.* 2006). The gene coding for IL-1RA (*IL1RN*) contains a polymorphism in exon 2 +2018T/C that is used as a marker for the variable number of tandem repeats (VNTR) in intron 2. Although not altering the encoded amino acid sequence, the rare allele (C) of the SNP +2018T/C, is in complete linkage disequilibrium with allele 2 of the intron 2 VNTR polymorphism which is associated with an increased production of IL-1RA protein (Danis *et al.* 1995, Clay *et al.* 1996).

Functional polymorphisms in cytokine genes have been associated with the resistance or susceptibility to a variety of pathologies, particularly chronic immune and inflammatory conditions (Dutra *et al.* 2009). Polymorphisms within the *IL1* gene cluster region have been widely studied for their possible influence in the development of oral pathologies with diverse results. A higher risk for external apical root resorption (EARR) after orthodontic treatment has been associated with genetic variants in the *IL1* gene cluster (Al-Qwasmi *et al.* 2003, Bastos Lages *et al.* 2009, Gülden *et al.* 2009, Iglesias-Linares *et al.* 2012a, 2012b, 2012c, 2013, Linhartova *et al.* 2013). On the other hand, *IL1B* gene polymorphism was not associated with the development of dental abscesses (de Sá *et al.* 2007, Amaya *et al.* 2013) and its influence in the healing of apical periodontitis after root canal treatment is controversial (Siqueira *et al.* 2009, Morsani *et al.* 2011). Positive and negative associations between the polymorphisms in the *IL1* gene and severe chronic periodontitis were observed in individuals from populations with different genetic background (Kinane *et al.* 2003, Moreira *et al.* 2005, Karimbux *et al.* 2012).

Due to the prominent role of IL-1 family members in regulating mineralized tissue resorption, and the possible modulation of its levels by gene polymorphisms, the aim of the present study was to investigate *IL1A* -889C/T (rs1800587), *IL1B* +3954C/T (rs1143634) and *IL1RN* +2018T/C (rs419598) gene polymorphisms in a sample of

Brazilian patients bearing replanted teeth after traumatic avulsion and to establish whether these SNPs are associated with the occurrence and severity of IERR.

MATERIAL AND METHODS

Study population and teeth

Study approval was obtained from the Committee on Ethics in Research of the FUMG (COEP-UFMG- 003.0.203.000-11). Case records and radiographs of 146 patients (107 males and 39 females), with 182 mature permanent replanted teeth, who were admitted to the Dental Trauma Clinic from the School of Dentistry of Federal University of Minas Gerais in Belo Horizonte, Brazil (DTC-SD-FUMG) from 1994 to 2011 were analyzed. Retrospective data regarding the patient's age at the time of injury, extra-alveolar period and storage condition of the avulsed teeth and pulpectomy timing were collected. The patients were referred to the Emergency Dental Service of Municipal Hospital Odilon Behrens (EDS- MHOB) for acute treatment and were directed to the DTC-SD-FUMG to proceed with treatment. The time elapsed between the trauma and the acute treatment ranged from 4h to 3 days. The replantation was performed according to the protocol adopted by the DTC-SD-FUMG since 1994, which was based upon information from the literature (Andreasen & Andreasen 1994). The avulsed teeth were held by the crown and rinsed with a physiologic salt solution. Saline irrigation was used to remove the intra-alveolar clot. In cases of extra-alveolar period greater than 60 minutes the PL was removed with gauze soaked in saline. No root surface treatment was performed. After the radiographic confirmation of the correct repositioning, the tooth was splinted with a double ligature wire (0.08"), slightly twisted and fixed with composite resin. Only teeth with closed apices were included in this study. Teeth with additional traumatic injuries and those with extensive restorations, a history of endodontic treatment, or radiographic signs of root resorption prior to the injury were excluded. Patients with history of previous trauma were likewise excluded. **Radiographic assessment of**

root resorption

Periapical radiographs taken at the onset of the endodontic therapy were independently examined by 2 investigators (JVB and MISC) in order to evaluate the presence, type and extension of root resorption. External bowl-shaped radiolucencies affecting both the root surface and adjacent bone were classified as IERR according to the criteria defined by Andreasen *et al.* (1995b). The resorption cavities were also assessed with the root resorption index developed by Andersson *et al.* (1989). Teeth

were grouped into two categories: IERR absent to mild (indexes ≤ 4) and moderate to severe IERR (indexes >4). Each radiograph was assigned a number to ensure that the analyses were performed blindly. Intra and inter-rater agreement values were estimated using the Kappa statistic (Hunt 1996). Radiographic standardization was based on established criteria (Andreasen & Andreasen 1985). Periapical radiographs were taken using the paralleling technique with small film (Kodak [®]Ultra-speed DF 58, size 2, Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) and film holders with a fixed object-focus distance of 33 cm (Cone[®], Maquira Dental Products, Maringá, PR, BR). The orientation of the central beam was directed between the 2 central incisors, between the right or left lateral and the central incisors or canines, depending on the traumatized teeth. All radiographs were taken at 70 kVp, 8 mA (Spectro 70X Eletronic[®] Dabi Atlante S/A , Medical & Dental Industry, Ribeirão Preto –SP, BR).

DNA extraction

After applying the clinical and radiographical inclusion criteria, the selected patients were scheduled to obtain epithelial cells through an oral swab performed with a sterile plastic spatula. After gentle scraping of oral mucosa the tip of the spatula was immediately immersed in 2-ml sterile microtubes containing 1.5 ml of Krebs buffer (KCl 4 mM, NaCl 124 mM, $C_6H_{12}O_6$ 10 mM, $C_8H_{17}N_2NaO_4S$ 23 mM, $MgSO_4$ 1 mM). DNA extraction was performed using a modified Boom's (1990) method. A pellet of epithelial cells was obtained by centrifugation at 200 g for 5 min. The supernatant was removed, and 20 μ l of silica (SiO_2 , Sigma, St Louis, MO, USA) and 450 μ l of GuSCN containing lysis buffer (L6) were added to the microtubes. Samples were homogenized with a vortex and incubated for 30 min at 56°C. Afterwards, the samples were submitted to another centrifugation, and the supernatant was discarded. The pellet obtained (with the DNA adsorbed on the silica) was washed twice with 450 μ l of GuSCN containing washing buffer (L2) twice with 450 μ l of 70% ethanol, and once with 450 μ l of acetone. The pellet was centrifuged between washes and was then dried at 56°C for 30 min. Finally, 100 μ l of TE buffer (elution buffer) was added, and the samples were incubated at 56°C for 12 h to release the DNA. After incubation, the solution was homogenized and centrifuged, and the supernatant containing the DNA was transferred to a new tube. The DNA concentration was measured with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technology, Wilmington, DE) and stored at -20°C until use.

Analysis of *IL1A* -889C/T, *IL1B* +3954C/T and *IL1RN* +2018C/T gene polymorphisms

The analysis of gene polymorphisms was performed using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) with TaqMan SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for the SNPs: *IL1A* -889C/T (rs1800587), *IL1B* +3954C/T (rs1143634) and *IL1RN* +2018C/T (rs419598). The reactions were performed in a total volume of 20µl containing 10µl of Genotyping Master Mix systems (Applied Biosystems), 0.5µl of primers and probes and 50ng of genomic DNA. The amplifications were made using a C1000™ Thermal Cycler/CFX96 Real-Time (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Statistical analysis

Genotype frequencies were tested for its effect in the occurrence and severity of IERR in accordance with established criteria in the literature (Sasiene 1997, Zou & Donner 2006). Binary logistic regression was used to analyze the extent that genotypes and clinical parameters interfered individually in the IERR extension. Variables that presented p values <0.25 in the univariate analysis were tested in the multivariate regression model. To take into account potential correlations in cases in which more than one tooth was replanted in the same patient, the data were analyzed using a marginal model (Generalized Estimation Equation – GEE) with a compound symmetry correlation matrix (Diggle *et al.* 2002), which is the standard approach for the marginal modeling of correlated data. The risk of severe IERR was calculated using adjusted odds ratios (95% confidence interval) and the level of significance was set at $p < 0.05$. Statistical analysis was performed using R software (Version 3.0.3, 2014, Vienna, Austria). Considering that polymorphisms within the *IL1* gene cluster are on the same chromosome (chr. 2), linkage disequilibrium and haplotype analysis were performed by using Haploview 4.2. Software (Broad Institute, Los Angeles, CA, USA).

RESULTS

Sample distribution according to age, clinical parameters and genotypes

Table 1 presents sample distributions according to age, clinical parameters and the studied genotypes. Patient's age at the time of injury ranged from 7.9 to 33.1 years (mean 13.1 ± 4.1 years). Individuals were grouped according to a cutoff point of 11 years of age since it has been previously demonstrated that this age represents a

benchmark for the risk of developing severe IERR (Bastos *et al.* 2014). Fifty five (37.7%) patients were under 11 years of age and 91 (62.3%) were older than 11 years of age at the moment of trauma. The median extra oral period of avulsed teeth was 130 min and ranged from 5 min to 3 days. Seventy two (39.6%), teeth were kept dry, 42 (23.1%) teeth were placed in milk and 68 (37.4%) teeth were stored in a wet media as follows: 36 (19.8%) teeth in saline, 20 (11.0%) in water and 12(6.6%) in saliva. Teeth kept dry for more than 20 min prior to storage in a wet medium were classified within the dry environment group as previously reported by Andreasen *et al.* (1995b). Timing of pulpectomy ranged from 6 h to 39.6 months with a median time of 2.2 months. Sample distribution according to genotypes of the studied SNPs showed that 11% of the subjects were homozygous (TT) for the minor allele of the *IL1A* -889C/T SNP. Five (3.4%) subjects were homozygous (TT) for the minor allele of the SNP +3954C/T in the *IL1B* gene and 6.8% were homozygous (CC) for the minor allele of the *IL1RN* +2018 SNP.

Root resorption activity

Radiographic signs of IERR were found in 75.3% of the cases with indexes ranging from 1 to 12 while 45 (24.7%) teeth showed no IERR (IERR index = 0). While 134 teeth presented IERR absent to mild (indexes ≤ 4) only 48 teeth showed moderate to severe IERR (indexes >4) that represented 73.6% and 26.4% of the cases, respectively. The agreement rates intra-examiner ($k=0.85$ and 0.82) and inter-examiners ($k=0.75$) were favorable.

Relationship between IERR and the patient's genotype, age, management of the avulsed tooth and timing of pulpectomy

Patient's age, extra-alveolar period, storage condition, timing of pulpectomy and genotypes of the studied SNPs were individually tested in relation to the risk of developing moderate to severe IERR. The adjusted odds ratios (95% confidence interval) for each one of these variables are presented in Tables 2 and Table3. Patient's age at the moment of trauma (OR 0.36 IC 95% 0.17–0.74 $p=0.006$) and timing of pulpectomy (OR 3.6 IC 95% 2.12 – 6.10 $p<0.001$) showed significant nominal p values related to the extension of root resorption. The length of extra-alveolar period and storage condition did not affected the risk of developing higher indexes of IERR. There were no significant differences in genotypes frequencies when compared the group with IERR absent to mild (≤ 4) and the group with IERR indexes moderate to severe (>4). Interestingly, patients who were homozygous for

the T allele (TT) at *IL1B* +3954C/T SNP, and for the C allele (CC) at *IL1RN* +2018C/T SNP, were less frequent among the group with IERR indexes moderate to severe although not reaching statistical significance ($p= 0.63$ and $p= 0.17$ respectively). Thus, given the fact that the *IL1RN* genotype analysis returned a p value lower than 0.25, it was included in the multivariate model together with age and timing of pulpectomy. The final model is presented in Table 4 and demonstrated that variations in the SNP +2018C/T in the *IL1RN* gene did not reach significance in the multivariate model (OR 0.15 IC 95% 0.02 -1.3 $p=0.09$). Time elapsed between replantation and the beginning of endodontic therapy increased progressively the risk of severe IERR (OR 3.5 IC 95% 2.0 - 6.2 $p<0.001$). Patient's older than 11 years of age at the moment of trauma had 71% less risk of having higher indexes of IERR (OR 0.29 IC 95% 0.12 – 0.67 $p=0.004$). For the SNPs studied, allelic frequencies did not deviate from Hardy–Weinberg equilibrium. The results of linkage disequilibrium analysis showed that the polymorphisms in the IL-1 cluster did not formed haplotypes in the present sample (rs1800587 $p=0.68$, rs1143634 $p= 0.70$, rs 419598 $p=0.27$).

DISCUSSION

Inflammatory external root resorption (IERR) represents a negative outcome after permanent teeth replantation causing rapid and irreversible damage to the root structure. Such sequelae may ultimately lead to tooth loss due to tooth exfoliation or cervical root fractures (Cvek 1992) with relevant functional, aesthetic, psychosocial and economic consequences (Cortes *et al.* 2002, Nguyen *et al.* 2004). Clinical studies have demonstrated the role of demographic and clinical factors such as age at the moment of trauma and timing of pulpectomy on the risk of developing IERR (Kirinons *et al.* 1999, Hinckfuss & Messer 2009, Bastos *et al.* 2014). On the other hand, recent clinical data have demonstrated that the healing process after replantation is strongly influenced by patient's immunological profile regardless the management of the avulsed tooth (Roskamp *et al.* 2011).

In the present study, the influence of SNPs in the *IL1* gene cluster was evaluated, together with demographic and clinical factors, on the prevalence and severity of IERR at the onset of the endodontic therapy after tooth replantation. Although clinical data was collected retrospectively, deficiencies frequently found in retrospective studies were overcome by the fact that the same standardized protocol and clinical registration forms were adopted in 1994 by both centers enrolled in the research

(EDS -MHOB and DTC-SD-FUMG). The replantation procedures in this protocol were adapted from the literature available at 1994 and adopted most of procedures described by Andreasen & Andreasen (1994). The current results showed that delayed pulpectomy together with patient's age younger than 11 years at the moment of trauma had a deleterious effect for the developing of IERR after replantation confirming previous reports (Coccia 1980, Andreasen *et al.* 1995a, Kirinons *et al.* 1999, Hinckfuss & Messer 2009, Weder *et al.* 2011, Bastos *et al.* 2014). This effect can be explained by the persistence of infection inside the root canal since there are no more viable blood vessels in the necrotic pulp tissue. Unless endodontic treatment is performed, bacteria and their byproducts continuously move out from the root canal through the wide dentinal tubules in young teeth and maintain a persistent inflammatory response at the root surface, which leads to progressive IERR.

The extra-alveolar period and storage conditions did not prove to affect the occurrence of IERR contrasting with previous studies (Kinirons *et al.*, 1999, Donaldson & Kinirons, 2001, Andreasen *et al.* 1995b). This comparison must take into account the delayed pulpectomy observed in the present sample. The prolonged exposure of the damaged PL to bacteria and their byproducts, might have overcome the effect of favorable extra-alveolar period, as it is well known that infection may protract or even prevent healing (Graves *et al.* 2011).

In the present study, no associations were observed between the *IL1A* -889C/T, *IL1B* +3954C/T and *IL1RN* +2018T/C gene polymorphisms and IERR indexes. This is the first study to investigate the potential role of SNPs in the *IL1* cluster as an influence in the susceptibility for IERR after tooth replantation. Although direct comparisons remains difficult, a parallel may be done with previous studies conducted in teeth bearing EARR after orthodontic treatment. While some studies reported a diminished susceptibility to EARR strongly associated with the presence of the C allele in the *IL1B* +3954C/T SNP (Al-Qawasmi *et al.* 2003, Bastos Lages *et al.* 2009, Iglesias-Linares *et al.* 2012b), such correlation could not be confirmed by others (Gülden *et al.* 2009, Linhartova *et al.* 2013, Pereira *et al.* 2013). Interestingly, an opposite effect was reported in endodontically treated teeth, i.e. carriers of the C allele showed an increased susceptibility to EARR (Iglesias-Linares *et al.* 2012a, 2012c). Such discrepancy was explained by the fact that in teeth with vital pulp the protective effect of the SNP +3954C/T in the *IL1B* gene was attributed to the enhanced bone remodeling rather than to a direct down regulation of the root resorption process (Al-

Qawasmi *et al.* 2003). The increased susceptibility in endodontically treated teeth was explained by the presence of a pro-resorptive microenvironment surrounding the root apex of these teeth (Iglesias-Linares *et al.* 2012a, 2012c). The association of the *IL1A* -889C/T SNP and EARR is also controversial since one study has reported a direct association in a German sample (Gulden *et al.* 2009) but the same result was not observed in other reports in Caucasian populations (Iglesias-Linares *et al.* 2012b, Linhartova *et al.* 2013). Recent reports have also suggested a probable protective role for the less frequent allele C of the *IL1RN* +2018 polymorphism against EARR in both, vital and endodontically treated teeth (Iglesias-Linares *et al.* 2012b, 2013, Linhartova *et al.* 2013).

Another comparison may be done with studies regarding the association of the *IL1B* +3954C/T SNP and the healing process of apical periodontitis. The present results are in line with those reported by Siqueira *et al.* (2009) that also showed lack of association between this SNP and the response to the endodontic treatment in a Brazilian sample. On the other hand, Morsani *et al.* (2011) observed a significant association between the presence of the C allele and persistent apical periodontitis in Americans. A lack of correlation was also reported regarding the development of acute and suppurative forms of apical periodontitis (de Sá *et al.* 2007, Amaya *et al.* 2013). The present results should be evaluated taking into consideration that IERR is multifactorial in nature and, at an individual level, disease expression is a result of the interplay between innate genetic susceptibility and differing exposition to environmental and clinical risk factors rather than an effect of a single gene. Other factors, such as the involvement of bacteria in amplifying inflammation, have a strong effect in disease development, masking the role of the gene polymorphism. Thus, the delayed pulpectomy observed in the present sample may have led to a prolonged exposure of the damaged PL to bacteria and their byproducts, equalizing the outcomes observed in the putative “favorable” and “unfavorable” genotypes. It is well established that lipopolysaccharide-induced production of IL-1 in periradicular lesions actively participate in positive loops of upregulation that may perpetuate destructive circuits (Graves *et al.* 2011). In fact, the present results showed that the timing of the pulpectomy remained as the most significant variable even after the multivariate model was performed. In addition, it should also be taken into account that differences in the composition and in the levels of bacterial species found in root canals may be an important indicator of the pathogenicity and hence, of disease

severity (Siqueira and Rôças 2009). Future studies on the current topic are therefore recommended.

Another interesting perspective arises from previous *in vitro* and *in vivo* studies in other areas that have underlined that the *IL1RN* +2018 T/C polymorphism, and not only the *IL1* SNPs themselves – could be the key regulator of IL-1 β and IL-1RA protein levels (Danis *et al.* 1995, Clay *et al.* 1996, Hurme & Santtila 1998 ,). Additionally, studies that performed the haplotype analysis of the *IL1* gene variants consistently pointed out to an association between EARR after orthodontic treatment and the *IL1RN* +2018 T/C SNP in vital and endodontically treated teeth (Iglesias-Linares *et al.* 2012b, 2013, Linhartova *et al.* 2013) but not always with the SNP +3954C/T in the *IL1B* gene (Linhartova *et al.* 2013) or with the SNP (-899 C/T) in the *IL1A* gene (Iglesias-Linares *et al.* 2013, Linhartova *et al.* 2013). In the present study the haplotype analysis of *IL1* gene variants was performed and none of the studied SNPs reached statistical significance. However the present results should be interpreted with caution due to the characteristics of a single-center study, even being based on the large sample size of 146 subjects. Because many alleles may have weak genetic effects, large studies and/or meta-analyses of multiple studies will often be required to determine whether genetic associations between polymorphisms and disease are significant (Hirschhorn *et al.* 2002). The effect of ethnicity was not considered in the present sample since classifying Brazilians into ethnic groups is not recommended due to the pronounced levels of admixture observed, mainly in the state of Minas Gerais, where the study was conducted (Parra *et al.* 2003). Additional large multi-center studies, in different ethnicities, are necessary.

CONCLUSION

The association between IERR and risk factors such as timing of the pulpectomy and patient's age at the moment of trauma was confirmed. On the contrary, *IL1* gene cluster SNPs did not affect the susceptibility for IERR in replanted permanent teeth.

REFERENCES

ity for IERR in replanted permanent teeth.

Table 1 – Sample distribution according to age, clinical parameters and genotypes

Variables		
Age at trauma n(%)*		
	≤ 11 years	55 (37.7)
	> 11 years	91 (62.3)
Extra-alveolar period (min)**		
	Median (Range)	130 min (5 min – 3 days)
Storage condition n(%)**		
	Dry	72 (39.6)
	Water, saline, saliva	68 (37.4)
	Milk	42 (23.1)
Timing of pulpectomy(days)**		
	Median (Range)	65.5 days (6 hours – 39.6 months)
<i>IL1A</i> (-889C/T) rs 1800587 n(%)*		
Genotype	CC	66 (45.2)
	CT	64 (43.8)
	TT	16 (11.0)
Presence/Absence allele T	T- (CC)	8 (54.8)
	T+ (CT+TT)	96 (45.2)
<i>IL1B</i> (+3953C/T) rs 1143634* n(%)		
Genotype	CC	102 (69.9)
	CT	39 (26.7)
	TT	5 (3.4)
Presence/Absence allele T	T- (CC)	102 (69.9)
	T+ (CT+TT)	44 (30.1)
<i>IL1RN</i> (+2018C/T) rs 419598* n(%)		
Genotype	TT	90 (61.6)
	CT	46 (31.5)
	CC	10 (6.8)
Presence/Absence allele C	C- (TT)	90 (61.6)
	C+ (CT+CC)	56 (38.4)

Table 2 – GEE model - Univariate analysis of relationship between demographic and clinical parameters according to IERR indexes

Variables	Index of IERR		GEE Model
	Absent to Mild (≤ 4) (n=134)	Moderate to Severe > 4 (n=48)	
Age at trauma	n(%)	n(%)	OR (IC 95%) p value
≤ 11 years	38 (61.3)	24 (38.7)	Reference
> 11 years	96 (80.0)	24 (20.0)	0.36 (0.17- 0.74) p= 0.006
Extra-alveolar period			
Median (Range)	150 min (5 min – 3 days)	120 min (15 min – 16 hours)	0.88 (0.67- 1.16) p= 0.36*
Storage condition	n(%)	n(%)	
Dry	51 (75.0)	17 (25.0)	Reference
Water, saline, saliva	31 (73.8)	11 (26.2)	0.95 (0.43 – 2.06) p=0.89
Milk	52 (72.2)	20 (27.8)	0.88 (0.35 – 2.24) p=0.79
Timing of pulpectomy(days)			
Median (Range)	44 days (6 hours – 39.6 mth)	158.5 Days (48days – 25.5 months)	3.6 (2.12 -6.10) p<0.001*

* OR calculated after logarithmic transformation

Table 3 - GEE model - Univariate analysis of relationship between genotypes of SNP rs 1800587, rs 1143634, and rs419598 and IERR indexes

Polymorfisms		Index of IERR	
		Absent to Mild (≤ 4) (n=134)	Moderate to Severe > 4 (n=48)
<i>ILIA</i> (-889C/T) rs 1800587		n(%)	n(%)
Genotype	CC	63 (73.3)	23 (26.7)
	CT	57 (75.0)	19 (25.0)
	TT	14 (70.0)	6 (30.0)
Presence/Absence allele T	T- (CC)	63 (73.3)	23 (26.7)
	T+ (CT+TT)	71 (74.0)	25 (52.1)
<i>ILIB</i> (+3953C/T) rs 1143634			
Genotype	CC	93 (73.2)	34 (26.8)
	CT	33 (71.7)	13 (28.3)
	TT	7 (87.5)	1 (12.5)
Presence/Absence allele T	T- (CC)	93 (73.2)	34 (26.8)
	T+ (CT+TT)	40 (74.1)	14 (25.9)
<i>ILIRN</i> (+2018C/T) rs 419598			
Genotype	TT	76 (71.0)	31 (29.0)
	CT	45 (73.8)	16 (26.2)
	CC	13 (92.9)	1 (7.1)
Presence/Absence allele C	C- (TT)	76 (71.0)	31 (29.0)
	C+ (CC+CT)	58 (77.3)	17 (22.7)

Table 4 – GEE model - multivariate analysis of relationship between age, timing of pulpectomy and IERR indexes prior to pulp extirpation		
Prognostic Factor	OR (IC 95%) p value	
	Univariate analysis	Multivariate analysis
Timing of pulpectomy (days)	3.6 (2.12 -6.10) p<0.001*	3.5 (2.0 -6.2) p<0.001*
Age at trauma		
≤ 11 years	Reference	Reference
> 11 years	0.36 (0.17- 0.74) p= 0.006	0.29 (0.12- 0.67) p= 0.004

* OR calculated after logarithmic transformation

ANEXO H- Manuscrito em preparação :***IL10* gene polymorphism is associated with inflammatory root resorption in replanted permanent teeth**

Abstract

Objectives: To evaluate the association between the *IL-10* -1082A/G polymorphism and the development of inflammatory external root resorption (IERR) after tooth replantation.

Material and Methods: 146 patients bearing replanted permanent teeth were genotyped for the SNP -1082A/G in the *IL10* gene. Logistic regression was performed to test the effect of genotypes along with age and factors related to the management and acute treatment of the avulsed tooth in the occurrence and extension of IERR. **Results:** Delayed pulpectomy increased the risk of severe IERR in a progressive manner (OR 4.7 IC 95% 2.73 – 8.1 p<0.001). Patients older than 11 years of age at the moment of trauma had 76% lower risk of severe IERR (OR 0.24 IC 95% 0.09-0.63 p=0.004). The G+ genotypes (AG+GG) of the SNP -1082 in the *IL10* gene showed 65% lower risk of developing severe IERR (OR 0.35 IC 95% 0.13-0.94 p=0.038).

Conclusions: The present study showed an association of the -1082A/G polymorphism and the risk of developing severe IERR in combination with putative risk factors as age and timing of pulpectomy. This fact stresses that IERR is multifactorial in nature and suggests that the patient's genetic profile may contribute in the outcome after tooth replantation.

Keywords: interleukin-10, single nucleotide polymorphism, inflammatory external root resorption; tooth avulsion, tooth replantation

INTRODUCTION

Inflammatory external root resorption (IERR) represents a serious complication after tooth replantation. It is a progressive process and may lead to exfoliation of the tooth or to cervical fracture due to the weakened root walls (Cvek, 1992). Histologically, IERR consists of areas of erosion in cementum and dentin presenting with many Howship's lacunae and odontoclasts, as well as regions of inflammatory infiltration in the neighboring periodontal tissue (Andreasen, 1980; Gunday *et al*, 1995). The onset of IERR results from healing events that are initiated immediately after injury to repair the damaged areas in periodontal ligament and root surface. This process also exposes dentinal tubules and allows for the passage of bacteria and their toxic products from the root canal to the lateral periodontal ligament (PL). Bacteria and their byproducts then intensify the resorption unless the infection is mechanically removed by endodontic therapy since this infection is inaccessible to the host's immune cells (Andreasen and Andreasen 1992). Such role of endodontic infection in the IERR pathogenesis has been observed experimentally (Andreasen, 1981a ;1981b; Trope *et al*, 1992) and reaffirmed clinically, especially after delayed pulpectomy (Andreasen and Hjørting-Hansen, 1966; Coccia, 1980; Donaldson and Kinirons, 2001; Chappuis and von Arx, 2005; Hinckfuss and Messer, 2009a; Weder *et al*, 2011; Bastos *et al*, 2014). Clinical data have also shown that IERR is markedly influenced by the age at the moment of trauma (Andreasen and Hjørting-Hansen, 1966; Andreasen *et al*, 1995a; Petrovic *et al*, 2010; Bastos *et al*, 2014), by the stage of root development (Andreasen and Hjørting-Hansen, 1966; Andreasen *et al*, 1995a; Petrovic *et al*, 2010), and by additional crown damage, visible contamination, or extra-alveolar dry conditions for longer than 15 min (Donaldson and Kinirons, 2001). However, these demographic and clinical parameters cannot completely explain inter-individual differences in the outcomes observed and little attention has been given to the role of host response. Recent clinical data from one study demonstrated that atopic patients, who predominantly produce anti-inflammatory cytokines, have a more favorable outcome after replantation despite differences in post-trauma management of the avulsed tooth (Rosakamp *et al*, 2011). In addition, recent findings have also suggested that differences in the patient's genetic profile may be a contributory factor in the predisposition to external apical root resorption after orthodontic treatment (Iglezias-Linares *et al*, 2012; 2013; Linhartova *et al*, 2013; Pereira *et al*; 2013).

Several studies have demonstrated associations of oral diseases with polymorphisms in genes coding for cytokines. Most of them result in abnormal cytokine gene transcription, thus influencing disease development and severity (Dutra *et al*, 2009). The -1082A/G polymorphism (also called 1087A/G in some studies) is located at a regulatory region of the *IL-10* gene (Kube

et al, 1995) altering the binding sites for various transcription factors, thereby affecting IL-10 production. The presence of the G allele has been associated with higher levels of IL-10 production *in vitro* (Turner *et al*, 1997) and *in vivo* (Larsson *et al*, 2011) and was found to be related to a decreased risk of diseases in which immune regulation contributes to the pathogenesis, such as chronic periodontitis (Jaradat *et al*, 2012), rheumatoid arthritis (Zhang *et al*, 2011), lumbar disk degeneration (Lin *et al*, 2011). IL-10 is a pleiotropic cytokine with strong anti-inflammatory properties. Among several other immunoregulatory activities, IL-10 directly inhibits osteoclasts generation and activation, conferring a protective role in periapical bone resorption (Menezes *et al*, 2008, Sabat *et al*, 2010). Given the important role of IL-10 in the pathogenesis of mineralized tissue resorption and the possible modulation of IL-10 levels by gene polymorphism which may affect clinical outcome, the aim of this study was to investigate the association of the SNP -1082A/G in the *IL10* gene and the occurrence and severity of IERR, in a sample of Brazilian patients with replanted permanent teeth after traumatic avulsion.

MATERIALS AND METHODS

Study population and teeth

The sample consisted of 146 patients, 107 males (73.3%) and 39 females (26.3%), with replanted teeth after avulsion who were admitted to the Dental Trauma Clinic at the School of Dentistry of UFMG in Belo Horizonte, Brazil, (DTC-SD-FUMG) from 1994 to 2011. Case records and radiographs were analyzed to collect retrospective data including the patient's age at the time of trauma, extra-alveolar period and storage conditions of the avulsed teeth, use of systemic antibiotic therapy (SAT), splinting period and type and time elapsed between replantation and the onset of endodontic therapy. The patients received acute treatment at the Emergency Dental Service of Municipal Hospital Odilon Behrens (EDS-MHOB) and were referred to DTC-SD-FUMG to proceed with treatment. The replantation was performed according to the protocol adopted since 1994, which was based upon information from the literature (Andreasen and Andreasen, 1994). The avulsed teeth were held by the crown and rinsed with a physiologic salt solution. Saline irrigation was used to remove the intra-alveolar clot. No root surface treatment was performed. After the correct repositioning was radiographically verified, the tooth was splinted with a double ligature wire (0.08"), slightly twisted and fixed with composite resin. Only teeth with closed apices were included in this study. Teeth with additional traumatic injuries and those with extensive restorations, a history of endodontic treatment, or radiographic signs of root resorption prior to the injury were excluded. Patients with a history of previous trauma were likewise excluded. Study approval was obtained from the Committee on Ethics in Research of the FUMG (COEP-UFMG- 003.0.203.000-11).

Radiographic assessment of root resorption

Periapical radiographs were taken immediately after the replantation and at the onset of the endodontic therapy and were independently examined by 2 investigators (JVB and MISC). Each radiograph was assigned a number to ensure that the analyses were performed blindly. Intra and inter-rater agreement values were estimated using the Kappa statistics (Hunt, 1986). Radiographic standardization was based on established criteria (Andreasen and Andreasen, 1985). Periapical radiographs were taken using the paralleling technique with small film (Kodak® Ultra-speed DF 58, size 2, Eastman Kodak Company Rochester, NY, USA) and film holders with a fixed object-focus distance of 33 cm (Cone®, Maquira Dental Products, Maringá, PR, BR). The orientation of the central beam was directed between the 2 central incisors, between the right or left lateral and the central incisors or canines, depending on the traumatized teeth. All radiographs were taken at 70 kVp, 8 mA (Spectro 70X Eletronic® Dabi Atlante S/A – Medical & Dental Industry, Ribeirão Preto –SP, BR). External bowl-shaped radiolucencies affecting both the root surface and adjacent bone were classified as IERR according criteria defined by Andreasen *et al* (1995a). The resorption cavities were also assessed with the root resorption index developed by Andersson *et al* (1989). Teeth were grouped into two categories: IERR absent to mild (indexes ≤ 4) and moderate to severe IERR (indexes > 4).

DNA extraction

DNA was purified from epithelial cells obtained through an oral swab performed with a sterile plastic spatula. After gentle scraping of oral mucosa, the tip of the spatula was immediately immersed in 2-ml sterile microtubes containing 1.5 ml of Krebs buffer (KCl 4 mM, NaCl 124 mM, $C_6H_{12}O_6$ 10 mM, $C_8H_{17}N_2NaO_4S$ 23 mM, $MgSO_4$ 1 mM). DNA extraction was performed using the Boom's (1990) method modified. A pellet of epithelial cells was obtained by centrifugation at 200 g for 5 min. The supernatant was removed, and 20 μ l of silica (SiO_2 , Sigma, St Louis, MO, USA) and 450 μ l of lysis buffer L6 (6.0 M GuSCN, 65 mM Tris-HCl pH 6.4, 25 mM EDTA and 1.5% Triton X-100) were added to the microtubes. Samples were homogenized with a vortex and incubated for 30 min at 56°C. Afterwards, the samples were submitted to another centrifugation, and the supernatant was discarded. The pellet obtained (with the DNA adsorbed on the silica) was washed twice with 450 μ l of washing buffer L2 (6.0 M GuSCN, 65 mM Tris-HCl pH 6.4), twice with 450 μ l of 70% ethanol, and once with 450 μ l of acetone. The pellet was centrifuged between washes and was then dried at 56°C for 30 min. Finally, 100 μ l of TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0 and 1 mM EDTA) was added, and the samples were incubated at 56°C for 12 h to release the DNA. After incubation, the solution was homogenized and centrifuged, and the supernatant containing the DNA was transferred to a new

tube. The DNA concentration was measured with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technology, Wilmington, DE) and stored at -20°C until use.

Analysis of the *IL-10* -1082G/A gene polymorphism

The gene polymorphism analysis was performed using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) with the TaqMan SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for SNP *IL-10* -1082(A/G) rs1800896. The reactions were performed in a total volume of 20 µl, which contained 10 µl of Genotyping Master Mix systems (Applied Biosystems), 0.5 µl of primers and probes and 50 ng of genomic DNA. The DNA was amplified using a C1000TM Thermal Cycler/CFX96 Real-Time (Bio-Rad Laboratories, USA).

Statistical procedures

Genotype frequencies were tested for its effect on the occurrence and severity of IERR in accordance with criteria previously established in the literature (Sasiene, 1997; Zou and Donner, 2006). Logistic Regression Model was used to analyze the extent that clinical parameters and genotypes interfered individually in the IERR extension. Variables that presented p values <0.25 in the univariate analysis were tested in the multivariate regression model. The risk of severe IERR was calculated using adjusted odds ratios (95% confidence interval) and the level of significance was set at p<0.05. Statistical analysis was performed using the software packages SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago IL, USA).

RESULTS

Table 1 presents sample distributions according to age, clinical parameters and the genotypes of the SNP -1082A/G in the *IL10* gene. Patient age at the time of injury ranged from 8.6 to 33.1 years (with a mean age of 11.9 ± 3.7 years). Individuals were grouped according to a cutoff point of 11 years of age since it has been previously demonstrated that this age represents a benchmark for the risk of developing severe IERR (Bastos *et al*, 2014). Fifty-five (37.7%) patients were under 11 years of age and 91(62.3%) were older than 11 years of age at the moment of trauma. The median extra-alveolar period for the avulsed teeth was 125 min, and this period ranged from 5 min to 3 days. Most of the teeth were stored in a dry environment (41.1%), followed by storage in wet media (36.3%), and in milk (22.6%). Teeth that were kept dry for more than 20 min prior to storage in a wet medium were classified in the dry environment group. This criterion was based on previous results showing that a combination of dry and wet storage resulted in a significantly lower healing rate amongst teeth kept dry for 20 min or more prior to storage in a wet medium (Andreasen *et al*, 1995d). Systemic therapy with amoxicillin was prescribed in 35.6% of the cases. Splinting times ranged from 7 days to 24.6 months, with a median time of 48 days Time elapsed between the replantation and the pulp extirpation ranged from 14 d to 40.1

months, with a median time of 2.1 months. Sample distribution according to genotypes showed that 86 (58.9%) subjects were homozygous for the major allele (AA), 44 (30.1%) were heterozygous and 16 (11.0%) subjects were homozygous (GG) for the minor allele of the SNP -1082A/G in the *IL10* gene.

Root resorption activity

IERR Indexes ranged from 0 to 12 and were grouped into 2 categories absent or low (≤ 4) and moderate to severe (>4), which represented 70.5% and 29.5% of the cases, respectively. The agreement indexes intra-examiner ($\kappa=0.85$ and 0.82) and inter-examiners ($\kappa =0.75$) were favorable (Hunt, 1996).

Relationship between IERR and the patient's genotype, age, management of the avulsed tooth and timing of pulpectomy

Patient's age at the moment of trauma, clinical parameters and genotypes of the SNP IL-10 -1082(A/G) were tested individually for their influence in the risk of developing severe to moderate IERR. Results from the univariate analysis are presented in Table 2 and revealed that patient's older than 11 years of age at the moment of trauma had a lower risk of developing higher indexes of IERR (OR 0.39 IC 95% 0.19-0.81 $p=0.01$). Timing of pulpectomy and splinting time (OR 4.27 IC 95% 2.56 - 7.12 $p<0.001$) progressively affected the risk of developing moderate to severe IERR (indexes >4). SAT use, length of extra-alveolar period and storage media had no significant effect in the IERR activity in the present sample. Patients who were homozygous for the allele G at *IL-10* gene SNP -1082A/G (GG) were less frequent among the group with higher indexes of IERR. This trend was also observed when considered the presence/absence of the polymorphic allele G (AG+GG), although not reaching statistical significance in the univariate analysis. Based on these results two multivariate models were constructed using a backward search strategy with variables that presented nominal values of $p<0.25$. Therefore in the first model the 3 genotypes were tested together with the timing of the pulpectomy, patient's age, splinting time and SAT use. In the second model, genotypes were grouped according to the presence of the polymorphic allele G (genotypes AG+GG) and were included along with the patient's age, timing of pulpectomy, splinting time and SAT use. Patient's age at the moment of trauma and timing of pulpectomy remained significant in both models. Splinting time was removed from the final model due to redundancies since it was quite similar to timing of pulpectomy. SAT use remained not significant in both models ($p= 0.87$ and $p=0.88$ respectively). When the 3 genotypes were tested individually, the effect of GG genotype did not reach significance ($p=0.11$) but, when grouped according to the presence of the polymorphic allele G the effect of the G+ genotypes (AG+GG), reached statistical significance

($p=0.038$). The final model is presented in Table 3 and demonstrated that timing of pulpectomy increased the risk of severe IERR in a progressive way (OR 4.7 IC 95% 2.73 -8.1 $p<0.001$). Patients older than 11 years of age at the time of trauma had 76% lower risk of severe IERR when compared with patients under 11 years of age (OR 0.24 IC 95% 0.09-0.63 $p=0.004$). The G+ genotypes (AG+GG) of the SNP -1082 in the *IL10* gene showed 65% lower risk of developing severe IERR when compared with the G- (AA) genotypes (OR 0.35 IC 95% 0.13-0.94 $p=0.038$).

DISCUSSION

The present study investigated the influence of the SNP -1082A/G in the *IL10* gene together with demographic and clinical factors, in the prevalence and severity of IERR after tooth replantation. To the best of our knowledge, there is no data regarding the potential role of a SNP in the healing process after traumatic injuries. Deficiencies frequently found in retrospective studies were overcome by using the same standardized treatment protocol and clinical registration forms that were adopted in 1994 by both centers enrolled in this research (EDS -MHOB and DTC-SD-FUMG). The present results suggested that the *IL10* genotype may be involved in the susceptibility to IERR since individuals with the G+ (AG+GG) genotype at the SNP -1082 in the *IL10* gene were found to have lower risk of developing severe IERR than those without the G allele (AA genotype). These findings are consistent with previous studies that reported an association between the carriage of the G allele (GG+GA) and a decreased risk of developing rheumatoid arthritis (Zhang *et al*, 2011). Moreover, positive allele A genotypes (GA, AA) at position -1082 had an increased risk of having chronic periodontitis (Jaradat *et al*, 2012) and of developing lumbar disc degeneration (Lin *et al*, 2011).

IL-10 is a multifunctional anti-inflammatory cytokine that is produced by activated immune cells and has beneficial effects in limiting the excessive immune response and tissue destruction (Sabat *et al*, 2010). Its protective effect in osteolytic lesions can be attributed to its ability to suppress the secretion of pro-inflammatory cytokines including IL-1, IL-6, IL-8 and TNF- α (Sabat *et al*, 2010) and to inhibit osteoclastogenesis (Menezes *et al*, 2008; Lorenzo *et al*, 2008). IL-10 has been demonstrated to be a protective factor against periapical bone resorption in endodontic infections and to reduce the severity of periodontitis (Menezes *et al*, 2008). IL-10 has also been demonstrated to have an inhibitory effect on osteoclastogenesis during root resorption in the primary dentition (Liu *et al*, 2006). Considering the role of bacteria in the etiology of IERR, the pivotal role of IL-10 in hampering the development of Th1 immunity and that the presence of the G allele has been associated with higher levels of IL-10 (Turner *et al*, 1997;

Larsson *et al*, 2011), it can be hypothesized that the protective effect observed in the present sample was due to the high levels of IL-10 in the carriers of the G+ genotypes. However, functional studies must be performed to confirm this hypothesis. Interestingly, the effect of the *IL10* polymorphism could only be evidenced in combination with putative primary risk factors such as age and timing of pulpectomy, This fact stresses that IERR is multifactorial in nature and, at an individual level, disease expression is a result of the interplay between innate genetic susceptibility and differing exposition to environmental and clinical risk factors rather than an effect of a single gene.

In the present sample, the acute treatment was performed in another center, and the patients were then instructed to seek treatment at the DTC – SD – FUMG, leading to a great variation in the time of the onset of endodontic therapy. Timing of pulpectomy represented an important risk factor affecting progressively the susceptibility to severe IERR This effect is in accordance with the literature (Kinirons *et al*, 1999; Hinckfuss and Messer, 2009a; Bastos *et al*, 2014) and can be explained by the absence of viable blood vessels in the necrotic pulp that renders the root canal a protected reservoir of bacteria, since they are inaccessible to the immune response. Unless the infection is mechanically removed by endodontic therapy, irritants move freely through dentinal tubules maintaining a persistent inflammatory process in the root surface. This host response plays a critical and protective role in resisting infection but also has destructive consequences (Andreasen and Andreasen, 1992, Graves *et al*, 2011).

The current results showed that younger patients, under 11 years of age at the moment of trauma, were more prone to develop severe IERR confirming previous reports by us and others (Andreasen *et al.*, 1995a; Petrovic *et al.*, 2010; Bastos *et al.*, 2014). The decision of grouping patients according to the cutoff point of 11 years was based in our previous results demonstrating that this age represented a benchmark for the risk of developing severe IERR (Bastos *et al*, 2014). Only mature teeth with closed apices were included in the present sample suggesting that mechanisms other than the known effect of the stage of root development may be involved. The wide dentinal tubules in young teeth might allow the irritants to move freely from the root canal space to the external root surface, resulting in faster and more extensive IERR (Andreasen and Andreasen, 1992).

The extra-alveolar period and storage conditions did not affect the occurrence of IERR in the present sample contrasting with previous studies (Kinirons *et al*, 1999; Donaldson and Kinirons, 2001; Andreasen *et al*, 1995b). This comparison must take into account the relatively small number of teeth kept dry for less than 15 minutes or stored in saline or water for less than 20 minutes in the present sample. This fact might have impaired more reliable comparisons. Teeth

stored in saliva and milk were replanted in a suitable time in 50% and 93.9% of the cases, respectively. Nonetheless the positive results reported in clinical (Andreasen *et al*, 1995b) and experimental investigations (Blömlöf *et al*, 1983) could not be confirmed. The prolonged exposure of the damaged PL to bacteria and their byproducts, due to the delayed pulpectomy observed in the present sample, might have overcome the favorable extra-alveolar period in milk or saliva, as it is well known that infection may protract or even prevent healing (Andreasen and Andreasen, 1992; Graves *et al*, 2011).

Splinting time did not affect IERR activity since, in the present sample the association observed in the individual analysis resulted from bias with the pulpectomy timing, as they were quite similar. The present results are in agreement with previous reports by us and others (Kinirons *et al*, 2000; Bastos *et al*, 2014). Likewise, systemic amoxicillin use had no effect on the risk of developing IERR observed at the onset of endodontic therapy. These results are in line with previous clinical data that have not found improved long-term periodontal outcomes after SAT use (Andreasen *et al*, 1995b, Barrett and Kenny, 1997), and with the results of a recent meta-analysis where the benefits of systemic antibiotic therapy were inconclusive (Hinckfuss and Messer, 2009b). These results can be explained by the fact that oral antibiotics cannot reach infection present inside the root canal which is ultimately responsible for the triggering of IERR and its progression.

The effect of ethnicity was not considered in the present sample since classifying Brazilians into ethnic groups based on phenotypic characteristics is not recommended due to the pronounced levels of admixture observed, mainly in the state of Minas Gerais, where the study was conducted (Parra *et al*, 2003). However some limitations of this study should be mentioned. First, even being based in a large sample size, it was a single-center investigation at a relatively small scale with a non-standardized distribution of the sample for the confounding factors. Multivariate logistic regression analyses was performed to control for these variables, but additional large case-control studies, with standardized risk factors and in different ethnic groups are necessary to further explore the hypothesis raised with the current results. Secondly, differences in the types and amounts of bacterial species found in root canals is an important indicator of the pathogenicity of the infection and hence of the host response severity (Siqueira and Rôças, 2009). Future studies on this topic are therefore also critical to enlighten our understanding of the pathogenesis of IERR.

In conclusion, the present study provide unique evidence that variations in the *IL10* gene had a significant protective effect against the development of severe IERR soon after tooth replantation in combination with putative primary risk factors such as age and timing of pulpectomy. This

fact stresses that IERR is multifactorial in nature and suggests that the patient's genetic profile may contribute in the outcome after tooth replantation.

ACKNOWLEDGEMENTS:

This study was supported by grants from PROEX-UFMG, PRPq – UFMG and CNPq. The authors declare no potential conflicts of interest with respect to the authorship and/or publication of this article.

Table 1 – Sample distribution according to age, clinical parameters and genotypes		
Variables		
Age at trauma n(%)		
	≤ 11 years	55 (37.7)
	> 11 years	91 (62.3)
Extra-alveolar period (min)		
	Median (Range)	125 (5 – 4320)
Storage condition n(%)		
	Dry	60 (41.1)
	Wet (Water, saline, saliva)	53 (36.3)
	Milk	33 (22.6)
Systemic Antibiotic Therapy		
	Yes	52 (35.6)
	No	94 (64.4)
Splinting Time (days)		
	Median (Range)	48 (7 – 749)
Timing of pulpectomy (days)		
	Median (Range)	65 (14 – 1206)
SNP <i>IL10</i> -1082A/G (rs 1800896) n(%)		
Genotype	AA	86 (58.9)
	AG	44 (30.1)
	GG	16 (11.0)
Presence/Absence allele G	G- (AA)	86 (58.9)
	G+ (AG+GG)	60 (41.1)

Table 2 – Logistic Regression Model – Univariate analysis between demographic and clinical parameters and IERR indexes

Variables	Index of IERR		OR (IC 95%) p value	
	Absent to Mild (≤ 4)	Moderate to Severe > 4		
Age at trauma	n(%)	n(%)		
≤ 11 years	32 (58.2)	23 (41.8)	Reference	
> 11 years	71 (78.0)	20 (22.0)	0.39 (0.19 – 0.81) p=0.01	
Extra-alveolar period (min)				
Median (Range)	150 (5 - 4320)	120 (15- 960)	0.89 (0.65 – 1.21) p = 0.44*	
Storage condition	n(%)	n(%)		
Dry	42 (70.0)	18 (30.0)	Reference	
Wet (Water, saline, saliva)	37 (69.8)	16 (30.2)	0.88 (0.34 – 2.25) p= 0.78	
Milk	24 (72.7)	9 (27.3)	1.01 (0.45 – 2.26) p= 0.98	
Systemic Antibiotic Therapy				
Yes	33 (32.0)	19 (44.2)	Reference	
No	70 (68.0)	24 (55.8)	0.60 (0.29 – 1.24) p = 0.16	
Splinting time(days)				
Median (Range)	36 (7 – 477)	118 (22 - 749)	4.27 (2.56 – 7.12) p <0.001*	
Timing of pulpectomy(days)				
Median (Range)	39 (0.6 – 1206)	170 (48 - 776)	4.27 (2.56 – 7.12) p <0.001*	
SNP <i>IL10</i> (-1082A/G) rs 1800896				
Genotype	AA	57 (66.3)	29 (33.7)	Reference
	AG	33 (75.0)	11 (25.0)	0.66 (0.29 - 1.48) p= 0.31
	GG	13 (81.3)	3 (18.8)	0.45 (0.12 – 1.72) p= 0.25
Presence/Absence allele G	G- (AA)	57 (66.3)	29 (33.7)	Reference
	G+ (AG+GG)	46 (76.7)	14 (23.3)	0.60 (0.28 – 1.26) p= 0.18

* OR calculated after logarithmic transformation

Table 3 –Logistic Regression Model - Multivariate analysis of relationship between IERR indexes and age, timing of pulpectomy and the presence of the G allele in the SNP <i>IL10</i> -1082A/G	
Absent to Mild (≤ 4) vs Moderate to Severe (> 4)	
Prognostic Factor	OR (IC 95%) p value
Timing of pulpectomy (days)	4.7 (2.73 – 8.1) p < 0.001*
Age at trauma	
≤ 11 years	Reference
> 11 years	0.24 (0.09 – 0.63) p =0.004
SNP <i>IL10</i> -1082A/G (rs 1800896)	
Presence/Absence allele G	
G- (AA)	Reference
G+ (AG+GG)	0.35 (0.13 – 0.94) p =0.038

- * OR calculated after logarithmic transformation

ANEXO I- Manuscrito em preparação: **Polymorphisms in RANK-RANKL-OPG axis and inflammatory external root resorption in replanted teeth**

Abstract

Objectives: To investigate the association of SNPs within the genes that code for proteins of the RANK-RANKL-OPG axis with the risk of developing inflammatory external root resorption (IERR). **Material and Methods:** 146 patients bearing 182 mature permanent replanted teeth, were genotyped for SNPs rs 8086340 in the *RANK/TNFRSF11A* gene, rs 2277438 in the *RANKL/TNFS11* gene and rs 2073618 in the *OPG/TNFRSF11B* gene. Patient's genotypes were tested for their association with the risk of developing IERR along with age and timing of pulpectomy as confounding factors using the Generalized Estimated Equation (GEE) model. **Results:** The presence of the C allele (CG + CC) at SNP rs 8086340 gene and the homozygosity for the G allele (GG) at SNP rs 2277438 were nominally associated with a lower risk of developing moderate to severe IERR (OR 2.39 IC 95% 1.04-5.47 p= 0.04 and OR 0.21 IC95% 0.05-0.94 p= 0.049, respectively). Such association did not persist after multivariate logistic regression analysis including age and timing of pulpectomy as covariates. **Conclusions:** In conclusion, this study could not provide evidence of an association between the studied SNPs with the risk of developing IERR in mature permanent replanted teeth. Additional studies are required to further explore this issue.

INTRODUCTION

Replantation is widely accepted as a therapeutic measure after avulsion of permanent teeth. However, its prognosis is controversial due to the occurrence of external root resorption (ERR) with reported prevalence ranging from 43.3% to 96% (Andreasen and Andreasen, 2007). The progressive form of inflammatory external root resorption (IERR) is particularly deleterious due to the irreversible damage caused to the root structure leading, not rarely, to ulterior tooth exfoliation or cervical root fractures (Cvek, 1992). IERR etiopathology involves a simultaneous damage to the periodontal ligament (PL), cementoblastic layer and the neurovascular bundle at the apical foramen. Immediately after the injury a healing process is initiated in the lateral PL resulting in areas of erosion of cementum and dentin due to the clastic activity in the external root surface. Although this process involves also attempts of pulp revascularization, this is a rare event in mature teeth leading to pulp necrosis and subsequent contamination of root canal space (Kling *et al* 1986). Bacteria and their byproducts traffic freely through dentinal tubules to the periodontal space where they promote more inflammation maintaining the root resorption active. Such role of bacteria in the IERR pathogenesis was observed experimentally (Andreasen, 1981a, 1981b, Trope *et al*, 1992) and reaffirmed clinically, especially in cases of delayed pulpectomy (Coccia, 1980; Chapuix and von Arx, 2005; Hinckfuss and Messer, 2009; Weder *et al*, 2011, Bastos *et al*, 2014). Younger ages at the moment of trauma (Andreasen *et al*, 1995a; Petrovic *et al*, 2009; Bastos *et al*, 2014), early stages of root development (Andreasen *et al*, 1995d, Petrovic *et al*, 2009, Weder *et al*, 2011), additional crown damage, visible contamination (Donaldson and Kinirons, 2001), or extra-alveolar dry conditions for longer than 15 min (Kinirons *et al*, 1999; 2000; Donaldson and Kinirons, 2001) have also been related to an increased risk of developing IERR. Beyond these clinical and demographic factors, clinical data has also suggested that the immune profile of the patient influenced the outcome after replantation despite differences in post-trauma management of the avulsed tooth (Rosakamp *et al*, 2011).

Not much is known about the immunology of dental resorption after traumatic injuries but it is believed that the cellular mechanisms of root resorption are quite similar to those of osteoclastic bone resorption, differing only in the relative substrata (Pierce, 1989; Sasaki, 2003). This premise is based on results from several studies showing that the RANK-RANKL-OPG axis are involved in the molecular events that occur during the physiological root resorption in primary teeth (Wise *et al*, 2000; Fukushima *et al*, 2003; Yao *et al*, 2004) and the pathologic external apical root resorption (EARR) in orthodontic treated tooth (Low *et al*, 2005; Yamaguchi *et al*, 2008).

The RANK-RANKL-OPG system includes three proteins members of the tumor necrosis factor receptor super family that regulates bone metabolism and osteoclast biology. The receptor activator of nuclear factor - kB (RANK/TNFRSF11A) is a type I membrane protein expressed mainly by the osteoclast precursors, osteoclasts and dendritic cells. The receptor activator of nuclear factor-kB ligand (RANKL/TNFSF11) is a type II homotrimeric transmembrane protein that may present as a membrane-bound cytokine expressed by osteoblastic lineage cells or as a soluble protein produced by

a variety of cell types and its expression is regulated by many physiologic and pathologic factors. The interaction of RANKL with RANK triggers a cascade of signaling molecules that culminates in the activation of transcription factors such as NF-kB, c-Fos, Fra-1 and NFATc1. These transcription factors induce expression of genes associated with osteoclast differentiation and function during normal bone remodeling and a variety of pathologic conditions. The RANK–RANKL interaction is negatively regulated by osteoprotegerin (OPG/TNFSR11B) a secreted soluble protein that is a decoy receptor for RANKL reducing the RANK–RANKL interaction and leading to the inhibition of osteoclastogenesis and bone remodeling (Lorenzo *et al*, 2008, Boyce and Xing, 2007). Due to the central role of the RANK-RANKL-OPG axis in bone metabolism and osteoclast biology, variations in the genes coding for these cytokines have been widely explored for their possible association with diseases that involve osteoclast bone resorption such as osteoporosis (Lee *et al*, 2010), Paget’s disease (Chung and Van Hul, 2012), arthritis rheumatoid (Assmann *et al*, 2010) and ankylosing spondylitis (Huang *et al*, 2011). SNPs in these genes have also been evaluated in relation to osteolytic oral disorders with different results. There is evidence that familial expansile osteolysis (FEO), a bone disorder characterized by osteolytic lesions in the long bones that can also result in spontaneous resorption of teeth and loss of the dentition, is caused by mutations in the *TNFRSF11A* gene that encodes RANK (Hughes *et al*, 2000). The susceptibility to develop EAR after orthodontic therapy was found to be correlated with a SNP at the *TNFRSF11A* (Al-Qawasmi *et al*, 2003) and with the *OPG/TNFSR11B* +1181 G/C SNP (Hartsfield, 2009). Studies conducted in patients with periodontitis failed to demonstrate a significant association between chronic periodontitis and the SNP rs2277438 in the *RANKL/TNFSF11* gene (Kadkhodazadeh *et al*, 2013) or with the *OPG/TNFSR11B* +1181C/G SNP (Wagner *et al*, 2007). The results regarding aggressive periodontitis (AP) are inconclusive since there are reports of a significant association in a Korean (Park *et al*, 2009) sample but not significant in a Japanese population (Soedarsono *et al*, 2006) This SNP +1181C/G, in the *OPG/TNFSR11B* gene, was also significantly associated with peri-

implantitis (Kadkhodazadeh *et al*, 2012) and with bisphosphonate induced osteonecrosis of the jaw (Katz *et al*, 2011).

Considering the pivotal role of RANK- RANKL-OPG axis in controlling mineralized tissue resorption and that functional polymorphisms could alter gene expression, the aim of the present study was to investigate the possible influence of the SNPs rs 8086340 in the *TNFRSF11A* gene, rs 2073618, in the *TNFRSF* gene and rs2277438 in the *TNFS11* gene in the occurrence and development of IERR in a large sample of Brazilian patients bearing replanted permanent teeth after traumatic avulsion.

MATERIAL AND METHODS

Study population and teeth

Retrospective data were collected from 146 patients (107 males and 39 females), who were admitted to the Dental Trauma Clinic from the School of Dentistry of Federal University of Minas Gerais in Belo Horizonte, Brazil (DTC-SD-FUMG) from 1994 to 2011, bearing 182 mature permanent replanted teeth. Acute treatment was accomplished at the Emergency Dental Service of Municipal Hospital Odilon Behrens (EDS- MHOB) and patients were referred to the DTC-SD-FUMG to proceed with treatment. The time elapsed between the trauma and the acute treatment ranged from 4h to 3 days. The replantation was performed according to the protocol adopted by both clinics since 1994, which was based upon information from the literature (Bastos *et al*, 2014). Only teeth with closed apices were included in this study. Exclusion criteria were: teeth with additional traumatic injuries, extensive restorations, or radiographic signs of root resorption or endodontic therapy prior to the injury. Patients with a history of previous trauma were likewise excluded. This study was conducted according to the ethical principles of the Helsinki Declaration with the full knowledge and written consent of patients and along with approval from the Committee on Ethics in Research of the FUMG (COEP-UFMG-003.0.203.000-11).

Radiographic assessment of root resorption

Periapical radiographs, taken immediately after the replantation and at the onset of the endodontic therapy, were blindly examined by two independent investigators (JVB and MISC) to assess the root resorption activity. External bowl-shaped radiolucencies affecting both the root surface and adjacent bone were classified as IERR according to the criteria defined by Andreasen *et al* (1995b). The resorption cavities were also assessed with the root resorption

index developed by Andersson *et al* (1989). Teeth were grouped into two categories: IERR absent to mild (indexes ≤ 4) and moderate to severe IERR (indexes >4). Radiographic standardization followed criteria previously described in the literature (Andreasen and Andreasen, 1985). Intra and inter-rater agreement values were estimated using the Kappa statistic (Hunt 1996).

DNA extraction and analysis of TNFSRF11A(RANK) rs 8086340, TNFSRF11B(OPG) rs2073618 and TNFS11(RANKL) rs 2277438 polymorphisms

DNA was purified from epithelial cells obtained through an oral swab performed with a sterile plastic spatula. After gentle scraping of oral mucosa, the tip of the spatula was immediately immersed in 2ml sterile microtubes containing 1.5 ml of Krebs buffer (KCl 4 mM, NaCl 124 mM, $C_6H_{12}O_6$ 10 mM, $C_8H_{17}N_2NaO_4S$ 23 mM, $MgSO_4$ 1 mM). DNA extraction was performed using a modified Boom's (1990) method. A pellet of epithelial cells was obtained by centrifugation at 200 g for 5 min. The supernatant was removed, and 20 μ l of silica (SiO₂, Sigma, St Louis, MO, USA) and 450 μ l of lysis buffer L6 (6.0 M GuSCN, 65 mM Tris-HCl pH 6.4, 25 mM EDTA and 1.5% Triton X-100) were added to the microtubes. Samples were homogenized with a vortex and incubated for 30 min at 56°C. Afterwards, the samples were submitted to another centrifugation, and the supernatant was discarded. The pellet obtained (with the DNA adsorbed on the silica) was washed twice with 450 μ l of washing buffer L2 (6.0 M GuSCN, 65 mM Tris-HCl pH 6.4), twice with 450 μ l of 70% ethanol, and once with 450 μ l of acetone. The pellet was centrifuged between washes and was then dried at 56°C for 30 min. Finally, 100 μ l of TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0 and 1 mM EDTA) was added, and the samples were incubated at 56°C for 12 h to release the DNA. After incubation, the solution was homogenized and centrifuged, and the supernatant containing the DNA was transferred to a new tube. The DNA concentration was measured with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technology, Wilmington, DE) and stored at -20°C until use. The analysis of gene polymorphisms was performed using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) with TaqMan SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for the SNPs rs 8086340 in *TNFSRF11A(RANK)* gene, rs2073618 in the *TNFSRF11B(OPG)* gene and rs 2277438 in *TNFS11(RANKL)* gene. The reactions were performed in a total volume of 20 μ l containing 10 μ l of Genotyping Master Mix systems (Applied Biosystems), 0.5 μ l of primers and probes and 50ng of genomic DNA. The amplifications were made using a C1000TM Thermal Cycler/CFX96 Real-Time (Bio-Rad Laboratories, USA).

Statistical procedures:

Data were analyzed using GEE (Generalized Estimated Equation), with a compound symmetry correlation matrix (Diggle *et al*, 2002), which is the standard approach for the marginal modeling of correlated data, in order to deal with potential correlations in cases in which more than one tooth was replanted in the same patient. Binary logistic regression was used to individually test patient's genotypes of each one of the studied SNPs individually or grouped according to the presence/absence of the polymorphic allele in accordance with established criteria in the literature (Sassiene, 1997; Zou and Donner, 2006). Variables that presented p values <0.25 in the univariate analysis were tested in the multivariate regression model. The risk of severe IERR was calculated using adjusted odds ratios (95% confidence interval) and the level of significance was set at $p < 0.05$. Statistical analysis was performed using R software version 3.0.3 (R -Viena, Austria).

RESULTS

Patient's age at the time of injury ranged from 7.9 to 33.1 years (mean 13.1 ± 4.1 years). Fifty-five (37.7%) patients were under 11 years of age and 91 (62.3%) were older than 11 years of age at the moment of trauma. The median extra oral period of avulsed teeth was 130 min and ranged from 5 min to 3 days. Seventy two (39.6%), teeth were kept dry, 42 (23.1%) teeth were placed in milk and 68 (37.4%) teeth were stored in a wet media as follows: 36 (19.8%) teeth in saline, 20 (11.0%) in water and 12(6.6%) in saliva. Teeth kept dry for more than 20 min prior to storage in a wet medium were classified within the dry environment group as previously reported by Andreasen *et al* (1995b). Timing of pulpectomy ranged from 6 h to 39.6 months with a median time of 2.2 months. One hundred thirty four teeth presented IERR absent to mild (indexes ≤ 4) while 48 teeth showed IERR moderate to severe (indexes >4) that represented 73.6% and 26.4% of the cases, respectively. The agreement indexes intra-examiner ($\kappa=0.85$ and 0.82) and inter-examiners ($\kappa =0.75$) were favorable. Patient's genotypes for each of the studied SNPs were tested individually and grouped according to the carriage of the polymorphic allele, in relation to the risk of developing moderate to severe IERR. Logistic regression was used to assess the odds ratios (OR) for severe IERR using wild-type homozygous as the reference group (Table 1). There were no significant differences in genotypes frequencies of the SNP rs 2073618 in the *TNFSRF11B(OPG)* gene comparing the groups with absent to mild (≤ 4) IERR and moderate to severe (>4) IERR. Patients who were homozygous for the G allele (GG) at SNP rs 2277438 in the *TNFS11(RANKL)* were less frequent within the group with moderate to severe IERR reaching statistical significance in the univariate analysis when compared individually with the two others genotypes (OR 0.21 IC95% 0.05-0.94 $p= 0.049$) or when compared with the carriers of the A allele (AG+AA) (OR 0.21 IC 95% 0.55 – 0.91 $p= 0.038$). Regarding the SNP rs 8086340 in the *TNFSRf11A(RANK)* gene it was found that patients homozygous for the G allele (GG) were more frequent within the group with lower indexes of IERR when compared with those carrying the C allele (CG + CC) (OR 2.39 IC 95% 1.04-5.47 $p= 0.04$). However, such associations lost significance after multivariate logistic regression analysis was performed including these SNPs together with age and timing of pulpectomy, since these variables were previously recognized as strong confounding factors (Bastos *et al*, 2014).

DISCUSSION

ERR represents a frequent negative outcome following the replantation of avulsed permanent teeth (Andreasen and Andreasen, 2007). Inflammatory external root resorption (IERR) is particularly troubling due to the rapid and irreversible damage to the root structure not rare leading to tooth loss, with relevant functional, aesthetic, psychosocial and economic consequences (Nyguen *et al*, 2004). Nevertheless, few attention has been given to the factors that may drive the early changes that determine ERR activity soon after tooth replantation. Clinical studies have shown that delayed pulpectomy (Coccia, 1980; Hinckfuss and Messer; 2009, Bastos *et al*, 2014), younger ages at the moment of trauma (Andreasen *et al*, 1995a; Petrovic *et al*, 2009; Bastos *et al*, 2014), early stages of root development (Andreasen *et al*, 1995a; Petrovic *et al*, 2009), additional crown damage, visible contamination (Donaldson and Kirinos, 2001), or extra-alveolar dry conditions for longer than 15 min (Kinirons *et al*, 1999, 2000; Donaldson and Kinirons, 2001) were related to an increased risk of developing IERR. However, these demographic and clinical factors are not able to completely explain interindividual variation in the outcomes observed and studies aiming the contribution of the host response are still rare, albeit being imperative to provide a pathobiological mechanism for different outcomes observed after tooth replantation. Driven by previous results showing that variants in genes that code for the axis RANK-RANKL-OPG may be associated with osteolytic oral disorders (Al-Qawasmi *et al*, 2003, Hartsfield, 2009, Park *et al*, 2008, Katz *et al*, 2011, Kadkhodazadeh *et al*, 2012), the present study retrospectively investigated for a possible association between SNPs in these genes in the prevalence and severity of IERR at the onset of the endodontic therapy after tooth replantation. Deficiencies frequently found in retrospective studies were overcome since standardized treatment protocol and clinical registration forms were adopted in 1994 by both centers enrolled in this study (EDS -MHOB and DTC-SD-FUMG). To the best of our knowledge, this is the first study to investigate the potential role of SNPs in genes coding for the RANK-RANKL-OPG protein axis as an influence in the susceptibility for IERR after tooth replantation. The present results showed that lower indexes of IERR predominated among patients carriers of the C allele (CG + CC) at SNP rs 8086340 in the *TNFSRF11A*(RANK) and homozygosis for the G allele (GG) at SNP rs 2277438 in the *TNFS11*(RANKL). Although direct comparisons are impaired, the present results contrasts with those reported by Furuya *et al* (2007) that patients carriers of the G allele had increased joint destruction in rheumatoid arthritis when compared to patients with the AG plus GG genotypes. Rhee *et al*. (2010) also observed significantly higher levels of mean urine deoxypyridinoline, a bone resorption marker, in postmenopausal Korean women carriers of the G allele compared with those with AA genotypes. Since the cellular mechanisms of this SNP is still not clear, the former and the present results

should be interpreted with caution and future functional studies are necessary to clarify this issue. The nominal associations observed for the *TNFSRF11A(RANK)* and *TNFS11(RANKL)* SNPs lost their significance after adjusting for covariates such as age and timing of pulpectomy in the multiple logistic regression model. Despite the lack of association in the final model, the influence of such polymorphisms should not be rejected. IERR is multifactorial in nature and, at an individual level, disease expression is a result of the interplay between innate genetic susceptibility and different exposition to environmental and clinical risk factors rather than an effect of a single gene. A possible explanation is that other factors, such as the involvement of bacteria in amplifying inflammation, have a strong effect in disease development, masking the role of the gene polymorphism. Thus, the delayed pulpectomy observed in the present sample led to a prolonged exposure of the damaged PL to bacteria and their byproducts equalizing the outcomes observed in the “favorable” and “unfavorable” genotypes. It is well established that lipopolysaccharide-induced production of Il-1 in periradicular lesions actively participate in positive loops of upregulation that may perpetuate destructive circuits (Graves *et al*, 2011). In addition, it should also be taken into account that differences in the composition and in the amount of bacterial species found in root canals may be an important indicator of the pathogenicity and hence of disease severity (Siqueira and Roças, 2009). Supporting such hypothesis a parallel can be drawn with previous reports of no significant differences in the prevalence of genotypes of *TNFS11(RANKL)* rs 2277438 SNP in other inflammatory conditions such as periodontitis (Soedarsono *et al*, 2006; Kadkhodazadeh *et al*, 2013) and peri-implantitis (Kadkhodazadeh *et al*, 2013).

The present study did not provide evidence for a role of the SNP rs 2073618 in the *TNFSRF11B(OPG)* gene in the prevalence and extension of IERR after tooth replantation. This result echoes with previous reports that failed to demonstrate an association between this SNP and aggressive (Soedarsono *et al*, 2006) or chronic periodontitis (Wagner *et al*, 2007, Park *et al*, 2008) but contrasts with significant associations reported for the G allele of this SNP with EARR (Hartsfield, 2009) and aggressive periodontitis (Park *et al*, 2008), and for the C allele with peri-implantitis (Kadkhodazadeh *et al*, 2012), and bisphosphonate induced osteonecrosis of the jaw – BONJ (Katz *et al*, 2011). However, although several studies associated the G allele with loss in bone mineral density and increased susceptibility for osteoporosis (Lee *et al*, 2010), the effect of this SNP in gene expression is still controversial since there are contradictory results regarding the association of genotypes and serum OPG serum levels (Zhao *et al*, 2005; Ueland *et al*, 2005; Kim *et al*, 2007; Mencej-Bedrac, 2011). Comparisons between the present results and the above mentioned studies should also take into account that this polymorphism shows substantial

variation in the frequency reported among different populations. Interestingly, the homozygous genotype for the polymorphic allele (CC) was the most prevalent in the present sample, diverging from previous reported frequencies. Since there is no data about this polymorphism in a Brazilian sample, such difference can be attributed to the pronounced levels of admixture observed in Brazilians, mainly in the state of Minas Gerais, where the study was conducted (Parra *et al*, 2003). In addition, while this study was performed using a large sample size of 146 patients, it is a single-center study. Additional large multi-center studies, in different ethnicities, are necessary to clarify this important issue.

In conclusion, within the limits of the present sample, this study did not provide evidence of an association between the TNFSRf11B(OPG) rs 2073618 SNP, TNFSRf11A(RANK) rs 8086340 SNPs and TNFS11(RANKL) rs 2277438 with the risk of developing IERR in mature permanent replanted teeth.

Table 1 - GEE model – Univariate and Multivariate analysis of relationship between the genotypes of SNPs rs 8086340, rs 2073618, rs 2277438, and IERR indexes

Polymorfisms	Index of IERR		GEE Model	
	Absent to Mild (≤ 4) (n=134)	Moderate to Severe >4 (n=48)	Nominal	Adjusted**
<i>TNFSRF11B(OPG)</i> (rs 2073618)		n(%)*	n(%)*	OR (IC 95%) p value
Genotype	GG	11 (68.8)	5 (31.3)	Reference
	GC	54 (70.1)	23 (29.9)	1.09 (0.30 - 3.88) p= 0.9
	CC	69 (77.5)	20 (22.5)	0.75 (0.21 - 2.71) p= 0.66
Presence/Absence allele G	G+ (GG+GC)	65 (69.9)	28 (30.1)	0.70 (0.34 - 1.43) p= 0.32
	G- (CC)	69 (77.5)	20 (22.5)	Reference
Presence/Absence allele C	C- (GG)	11 (68.8)	5 (31.3)	Reference
	C+ (GC+CC)	123 (74.1)	43 (25.9)	1.11 (0.33 - 3.78) p= 0.87
<i>TNFSF11RANKL</i> rs 2277438		n(%)*	n(%)*	OR (IC 95%) p value
Genotype	AA	79 (74.5)	27 (25.5)	Reference
	AG	35 (67.3)	17 (32.7)	1.19 (0.55 - 2.58) p=0.65
	GG	20 (83.3)	4 (16.7)	0.23 (0.05 - 1.03) p=0.051
Presence/Absence allele A	A+ (AA+AG)	114 (72.2)	44 (27.8)	0.21 (0.05 - 0.94) p=0.041
	A- (GG)	20 (83.3)	4 (16.7)	Reference
Presence/Absence allele G	G- (AA)	79 (74.5)	27 (25.5)	Reference
	G+ (AG+GG)	55 (72.4)	21 (27.6)	1.06 (0.52 - 2.18) p=0.87
<i>TNFSRF11A(RANK)</i> (rs 8086340)		n(%)*	n(%)*	OR (IC 95%) p value
Genotype	GG	54 (83.1)	11 (16.9)	Reference
	GC	50 (65.8)	26 (34.2)	2.68 (1.12 - 6.44) p= 0.027
	CC	30 (73.2)	11 (26.8)	1.91 (0.68 - 5.33) p= 0.22
Presence/Absence allele G	G+ (GG+GC)	104 (73.8)	37 (26.2)	1.03 (0.45 - 2.39) p= 0.94
	G- (CC)	30 (73.2)	11 (26.8)	Reference
Presence/Absence allele C	C- (GG)	54 (83.1)	11 (16.9)	Reference
	C+ (GC+CC)	80 (68.4)	37 (31.6)	0.42 (0.18 - 0.96) p=0.039

*Teeth distribution (n=182) ** Adjusted for age and timing of pulpectomy

ANEXO J- Certificado da Premiação do trabalho “Factors associated to root resorption after replantation of permanent teeth” 1º. Lugar na categoria Estudo clinico ou básico durante o 17º. Congresso Mundial de Traumatismos Dentarios



17th WORLD CONGRESS ON DENTAL TRAUMATOLOGY

Science and Art: Overcoming the limits of Knowledge

We certify that JULIANA VILELA BASTOS; Maria Ilma Souza Côrtes; Ricardo Santiago Gomez; Walderez Ornelas Dutra, of the poster entitled FACTORS RELATED TO ROOT RESORPTION AFTER REPLANTATION OF PERMANENT INCISORS received the 1st position in the category “Clinical or Basic Science Study”, at the 17th World Congress On Dental Traumatology, held from 19 to 22 September 2012, at the Hotel Windsor Barra in Rio de Janeiro, Brazil.

	
Dr. Renato Lerner President of Congress	Dr. Roberto Prado Scientific Director
	
Dr. Lars Andersson President of IADT	Dra. Sandra Fidel President of SBTB
	
	Dr. Nicolás Homsi President of CBCTBMF

ANEXO K- Certificado da Premiação do trabalho “Factors associated to root resorption after replantation of permanent teeth” ganhador do prêmio “Jens Over Andreasen “ durante o 17º. Congresso Mundial de Traumatismos Dentarios

SBTBD
Sociedade Brasileira de Traumatologia Dentária

IADT
International Association of Dental Traumatology

Penn Dental Medicine

CBCTBMF

17th WORLD CONGRESS ON DENTAL TRAUMATOLOGY

Science and Art: Overcoming the limits of Knowledge

We certify that **JULIANA VILELA BASTOS**; **Maria Ima Souza Côrtes**; **Ricardo Santiago Gomez**; **Walderez Ornelas Dutra**; of the poster entitled **FACTORS RELATED TO ROOT RESORPTION AFTER REPLANTATION OF PERMANENT INCISORS**, received the **1st position of the Jens Andreasen Award**, at the **17th World Congress On Dental Traumatology**, held from **19 to 22 September 2012**, at the **Hotel Windsor Barra** in **Rio de Janeiro, Brazil**.

Dr. Renato Lenz
President of Congress

Dr. Roberto Prado
Scientific Director

Dr. Lars Andersson
President of IADT

Dra. Sandra Fidel
President of SBTBD

Dr. Nicolás Homsi
President of CBCTBMF

CERTIFICATE