

IGOR MARIOTTO BENETI

***INFLUÊNCIA DA OCLUSÃO DENTÁRIA EM RATOS
SUBMETIDOS A REIMPLANTE IMEDIATO. ESTUDO
HISTOLÓGICO DO PERIODONTO E IMUNO-
HISTOQUIMÍCO DOS RESTOS EPITELIAIS DE
MALASSEZ E CÉLULAS CLÁSTICAS.***

Araçatuba - São Paulo

2016

IGOR MARIOTTO BENETI

INFLUÊNCIA DA OCLUSÃO DENTÁRIA EM RATOS SUBMETIDOS A REIMPLANTE IMEDIATO. ESTUDO HISTOLÓGICO DO PERIODONTO E IMUNO-HISTOQUIMÍCO DOS RESTOS EPITELIAIS DE MALASSEZ E CÉLULAS CLÁSTICAS.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, para obtenção do título de Doutor em Odontologia. Área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.

Orientador: Prof. Adj. Celso Koogi Sonoda

Co-Orientadores:

Professora Assist. Dra Daniela Atili Brandini

Professor Adj. Claudio Aparecido Casatti

Araçatuba - São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

B465e Beneti, Igor Mariotto.
Influência da oclusão dentária em ratos submetidos a
reimplante imediato. Estudo histológico do periodonto e
análise imuno-histoquímico dos restos epiteliais de
malassez e células clásticas / Igor Mariotto Beneti. -
Araçatuba, 2016

112 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Celso Koogi Sonoda
Coorientadora: Profa. Daniela Atili Brandini de Weert

1. Reimplante dentário 2. Oclusão dentária traumática
3. Ligamento periodontal I. T.

Black D7
CDD 617.64

Dedicatórias

A Deus,

Obrigado, meu pai, por tudo que tem realizado em minha vida. Obrigado por esses 13 anos maravilhosos de aprendizado e realizações em Araçatuba. Só posso agradecer por todas essas bênçãos alcançadas em minha vida nesse período. A fé em sua presença me faz crescer e continuar caminhando.

Aos meus Pais Wander e Valdira,

Pai e mãe obrigado por todo o amor, alicerce, amizade, incentivo e dedicação na minha formação como pessoa sempre. Só posso agradecer a Deus por colocar vocês em minha vida. Obrigado por tudo que fizeram e fazem por mim. Essa conquista é para vocês também. Amo muito vocês.

Ao meu irmão, Ian,

Obrigado meu irmão pelos conselhos, amizade e companheirismo. Apesar dos quinhentos quilômetros de distância nunca estamos longe um do outro. Essa conquista tenho de dividir com você que sempre me incentivou também. Amo muito você. Obrigado por fazer parte da minha vida.

A minha esposa, meu amor, Aline Leonardi Vieira,

Meu amor obrigado por todo apoio, dedicação e sofrimento ao meu lado para que conseguisse chegar em mais essa conquista. Dedico esse trabalho a você que sempre me apoiou e aguentou todo o sofrimento da distância. Obrigado por todo seu amor, o qual realmente me manteve em pé e me reergueu nos momentos que mais precisei. Obrigado Senhor por colocar meu amor na minha vida e agora na minha família.

Aos meus Avos Waldemar, Luis e Sebastiana

Mesmo hoje vocês não estando aqui presentes de maneira física, estão no meu coração sempre, não tem como não dedicar essa conquista a vocês. Obrigado por todo amor e momentos felizes sempre. Sei que hoje estão mais orgulhosos de mim.

À minha avó Ruthe,

Minha vizinha, esse dia tão feliz dedico a você também. Obrigado meu pai por permitir dividir essa conquista com minha vó entre nós. Te amo muito minha vó querida.

Ao meu tio avô,

Tio Wanguimir(Vagner) essa conquista em especial posso dedicar com certeza para você. Tio se não fosse seus conselhos, carinho, amizade e amor por mim e pelo meu irmão. Graças a você tio que pensou em nosso futuro e deu condições de realizarmos nossos sonhos, eu não teria chegado tão longe. Sei que ai do céu hoje o senhor está feliz e muito orgulhoso com mais essa minha conquista.

Ao meu Padrinho, Valdemar Mariotto Filho,

Tio Mazinho, esse cara que sempre me espelhei dentro da minha profissão. Um dentista humano, dedicado e profissional diferenciado. Dedico ao senhor essa conquista.

Aos meus Familiares

Aos meus tios e tias Carlos, Izabel, Gilda, Wilson e Silvia e os primos Andressa, Daniel, Daniele e Pedro. Obrigado pela torcida e apoio de vocês sempre.

Tia Neusa e Tio Waltinho

Deus preferiu que vocês assistissem essa minha conquista ai de cima, sei que estão muito orgulhosos pelo dia de hoje. Obrigado por todo carinho, ensinamentos e amizade. Amo muito vocês.

A Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Querida FOA do meu coração agradeço a cada mestre que passou por minha vida nessa escola. Agradeço aos funcionários, amigos e colegas que fiz aqui. Cheguei um jovem e saio hoje um homem. Após 13 anos nessa escola só posso agradecer por tudo que conquistei nesse período. Graças a você sou um profissional que posso fazer com que as pessoas sorriem. Graças a você posso formar novos profissionais que ajudaram nessa missão de levar saúde para os nossos irmãos que tanto precisam. Sempre levarei as cores e ensinamentos dessa escola por onde eu passar. Obrigado por ter existido em minha vida e um até breve.

Ao meu orientador,

Professor Celso Koogi Sonoda, obrigado pela dedicação e amizade. Tenho que agradecer o apoio sempre. O senhor é um exemplo de profissional completo. Muito Obrigado

Minha Orientadora,

Professora Daniela Atili Brandini, ou melhor, Dani, porque assim que chamo a pessoa que além de orientadora é em primeiro lugar uma grande amiga. Obrigado é uma simples palavra que diz muito para mim, ela aqui representa toda minha gratidão por tudo que você fez por mim. Tenho que agradecer por toda a paciência, dedicação, ensinamentos e amizade. Desculpe os momentos de ausências. Obrigado por fazer parte de todo meu crescimento professora. Você é e sempre será uma grande amiga que ganhei e continuarei tendo em minha vida.

Ao meu Coorientador,

Professor Cláudio Aparecido Casatti, muito obrigado por todos ensinamentos, oportunidades de crescimento e confiança em mim. Tenho em você uma pessoa que me espelho e admiro. Hoje professor além de orientador tenho um amigo. Obrigado por tudo.

Ao Professor Idelmo Rangel Garcia Junior,

Um cirurgião que tem o dom de operar e um grande mestre que me mostrou como deve ser o papel de professor, sempre estimulando o aluno a pensar. Pessoa mais humana com os pacientes que conheço e de um coração sem tamanho. Professor, muito obrigado pelos ensinamentos nessa caminhada. Tenho no senhor um grande espelho e amigo. Ficam aqui meus eternos agradecimentos pelos ensinamentos.

Ao Amigo e Mestre Dr. Elias Naim Kassis

Agradeço ao amigo Dr. Elias por todos os conselhos, ensinamentos e amizade sempre. Graças a você realizei o sonho de ser professor e estou crescendo como cirurgião. Muito obrigado por toda confiança depositada em mim. Doutor Elias o senhor foi uma pessoa que mesmo não me conhecendo apostou em mim. Só tenho muita admiração e gratidão por você. Muito obrigado por tudo.

A Amiga Professora Dra. Alessandra Marcondes Aranega,

Muito obrigado por toda confiança, dedicação, preocupação e orientação desde a época de graduação. Você é um exemplo de dedicação, bondade e luta professora. Obrigado pela sua amizade.

Aos meus Orientadores na graduação,

Professora Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune, minha primeira orientadora que mostrou a ciência no primeiro e segundo ano de faculdade.

A professora Sandra Maria Herondina Ávila de Aguiar, simplesmente me mostrou no CAOÉ como fazer o bem para o próximo é bom. Com certeza o maior aprendizado que tive na Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Obrigado por tudo, professora.

A Maria Lúcia Marçal Mazza Sundefeld, obrigado por todos os ensinamentos e dedicação nesse período. A senhora me ensinou como é ser um pesquisador.

Ao Professor Éder Ricardo Biasoli, obrigado professor por todos os ensinamentos, pela amizade e crescimento no período que fiquei no COB. Esse período foi de grande aprendizado e evolução como pessoa.

Aos Mestres professores da Cirurgia,

Professor Titular Michel Saad Neto que simplesmente é um exemplo de carinhoso e dedicação à docência. Obrigado professor por todos ensinamentos, exemplos e conselhos. Tenho o senhor, como o maior exemplo, de o que é ser professor.

À Professora Dra. Cristiane Mara Ruiz de Sousa Fattah, que embora não esteja mais presente na Cirurgia, contribuiu imensamente com a minha formação. Obrigado pela dedicação, respeito e pelo carinho que sempre teve com os alunos.

Ao Professor Dr. Osvaldo Magro filho, Dinho, obrigado pelos ensinamentos, amizade, e por ser essa pessoa que passa alegria para os alunos.

Ao Professor Dr. Tetuo Okamoto in memoriam, pelo exemplo de humildade, competência, caráter e dedicação incansável. A Universidade e a Pós-graduação como um todo (alunos e professores) têm uma imensa gratidão pela contribuição imensurável que o senhor fez por todos nós. Obrigado pelas orientações e sugestões.

A Professora Dra. Daniela Ponzoni, obrigado pelo apoio e ensinamentos.

A Professora Ana Paula Farnezi Bassi, obrigado por todos os ensinamentos e confiança nos trabalhos. A cirurgia ganhou muito com uma pessoa tão competente como professora.

O Professor Francisley Ávila Souza, obrigado pelos ensinamentos.

Aos Docentes da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP: Professores (as) Doutores (as) Denise Pedrini Ostini, Wilson Roberto Poi, Sônia Regina Panzarini Barioni, Wirley Gonçalves Assunção, Paulo Henrique dos Santos, Eduardo Passos Rocha, Edilson Ervolino, Alaíde Gonçalves, José Américo de Oliveira, Paulo Roberto Botacin, Roelf Justino Cruz Rizzolo, João César Bedran de Castro, Roberta Okamoto pelos ensinamentos e disponibilidade em ajudar.

A funcionária Cleide Lemes da Silva Toquetão pelo carinho, dedicação, preocupação e felicidade que passa para todos. Obrigado

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Ciências Básicas: Maria Dirce Colli Boatto, Gilmar Martins de Oliveira, Paulo Roberto Gratão, André Luís Mattos Piedade, Sandra Aparecida dos Santos Pinheiro, Arnaldo César dos Santos agradeço pelos ensinamentos da tese, pela compreensão e Amizade.

Aos Funcionários do biotério Seu Camilo, João e Alan. Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP (Izamar, Cláudio, Alexandra, Maria Cláudia, Cláudio, Ana Cláudia, Isabel, Ana Paula, Luzia, Fátima Denise, João e Ivone), pela disponibilidade em ajudar sempre e pelo carinho.

Aos meus amigos,

In Memoriam,

Ao meu amigo-irmão Daniel Castro Corbucci. Obrigado pelos momentos de amizade e alegria compartilhados. Sei que você está aí no céu torcendo muito por mim. Meu amigo dedico essa conquista a você também.

Sara Vieira Pacanaro, obrigado por toda sua dedicação, amizade e colaboração para realização desse trabalho. Com certeza essa conquista não teria acontecido sem você também. Deus quis que você ficasse feliz hoje a distância, mais uma vez meu muito obrigado.

Não posso deixar de agradecer a torcida dos amigos mais próximos Daniel Almeida, Milene Moreira, Renata Reis, Leticia Marcos, Junior Castro, Luana Barbosa, Antônio Ranieri, Guilherme Batistella, Elton Pires, Rubens Pinati, Matheus Gonçalves, Tiago Marciano, Ederson Rizzo, Renato Colenci, Lucas Tabata, Bruno Coelho, Daniel Magosso e Conceição Leonardi.

Aos Amigos de pós-graduação Marina, Jéssica, Thallita, Albanir, Marcus, Leonardo, Gabriel, Fernanda, Juliana, Pilar, Rodrigo, Nicolas, Ellen, Elisa, Marcelo, Sabrina e André.

Aos amigos em especial Lamis, Pamela, Fernando, Abrahão, Pedro, Rodolfo, Cristiano, Cassiano e Heloísa. Obrigado por todos os momentos de alegria e companheirismo durante esse período.

Aos Amigos da Unipós

Agradeço aos colegas Rodolfo Anchieta, Marcelo Ramires, Paula Bernardes, Fabio Linhares, Leandro Tempest, Marcelo Rudnick, Vanda Miasaki, Patricia, Andreia, Luciana, Ester, Rolemberg, Roberta, Rafael, Cleber, Éder, Nivaldo de Rio Preto da Unipós por todo apoio, ensinamentos e amizade nessa caminhada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–CAPES, pelo apoio financeiro concedido por meio da Bolsa de Doutorado que contribuiu, sobremaneira, com a realização deste trabalho.

Epígrafe

“ Se todos seus esforços forem vistos com indiferença, não desamine, porque o Sol ao nascer dá um espetáculo todo especial, e, no entanto, a maioria da plateia continua dormindo. Assim, é melhor tentar e falhar que se preocupar em ver a vida passar. É melhor tentar, ainda que em vão, que se sentar fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver”.

Martin Luther King

Beneti, IM. **Influência da oclusão dentária em ratos submetidos a reimplante imediato. Estudo histológico do periodonto e imuno-histoquímico dos restos epiteliais de Malassez e células clásticas.** (Tese de Doutorado). Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista; 2016.

Resumo

Alguns fatores podem interferir no prognóstico do reimplante imediato, como a fase da rizogênese dentária, o período de tempo no meio extra-alveolar, meios de conservação, contaminação, o uso e tipo de contenção dentária e a oclusão traumática. Este estudo visa avaliar a influência da ausência ou excesso de carga oclusal no processo de reparo do periodonto, com ênfase nas características histológicas, e analisar dos restos epiteliais de Malassez e das células clásticas na raiz mesial do primeiro molar superior de ratos submetidos a reimplante imediato. Foram divididos em grupos controle (GC), infra-oclusão (GIO) e oclusão traumática (GOT) e os períodos experimentais avaliados de 3, 5, 7, 14 e 30 dias. Análises qualitativas e quantitativas foram realizadas em cortes histológicos corados pelo método da hematoxilina e eosina (HE); e células clásticas (fosfatase ácida resistente ao tartarato, TRAP) e os restos epiteliais de malassez (citoqueratina) pela técnica de imuno-histoquímica. Os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, considerando $p < 0,05$ como significativo. No período de 5 dias, os animais do grupo GIO apresentaram espessura do ligamento periodontal e porcentagem da área de matriz extracelular fibrilar e não fibrilar significativamente menor. No 7º dia, animais do GIO mostraram uma redução significativa da porcentagem da área de matriz extracelular não fibrilar e número de células clástica, sendo o oposto no grupo GOT. Aos 30 dias a porcentagem de matriz extracelular não fibrilar e número de células clástica foram menores, e o número de perfil nuclear foi maior no GIO. A oclusão traumática aumentou significativamente o número de células clásticas, enquanto a ausência de forças oclusais retardou o aparecimento e o número das mesmas. Os restos epiteliais de Malassez foram evidenciados, principalmente presente no período de 3 dias pós-operatório e, raramente visualizados nos demais tempos experimentais. Em conclusão, baseado no modelo experimental adotado, pode ser notado que a carga oclusal imediata deve ser evitada nos dentes submetidos ao reimplante imediato sem contenção.

Palavras-chaves: Reimplante dentário, Oclusão dentária traumática, Ligamento periodontal.

Beneti, IM. **Influence of dental occlusion in the periodontium of the teeth rats submitted to immediately replantation. Study of epithelial remains of Malassez and clastic cells.** (Tese de Doutorado). Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, 2016.

Abstract

Among the factors that can interfere in the immediate tooth replantation prognosis there are the phase of root formation, the extra-alveolar period, storage media, contamination, use and type of dental splint and traumatic occlusion. This study aims to evaluate the influence of absence or excessive occlusal load on periodontal healing process, with emphasis on homeostatic function of epithelial remains of Malassez and clastic cells, dental root of rat molars submitted of immediate replantation. We used 150 male rats , with 5 weeks of life, divided into Control group (GC) infra occlusion (IOG) and traumatic occlusion (TOG) and the experimental periods evaluated 3, 5, 7, 14 and 30 days. Qualitative and quantitative analyzes were performed on histological sections stained by hematoxylin and eosin (HE); and clastic cells (TRAP) and epithelial remains of Malassez (PAN Cytokeratin) by immunohistochemistry. The data were submitted to the Kruskal-Wallis test post hoc Dunn, the statistical program Graph Prism 6.0 ($\alpha = 5\%$). The epithelial remains of Malassez were present in the 3-day period and absent in other experimental times, in all the groups. In the 5-day period IOG shows thickness of the periodontal ligament and the percentage of fibrillar and non fibrillar extracellular matrix area significantly lower. On the 7th day IOG showed a significant reduction of the percentage of non fibrillar extracellular matrix area and clastic number of cells, and OTG shows the opposite. At 30 days the percentage of non-fibrillar extracellular matrix and the number of clastic cells was lower, and the number of cell profiles was higher in IOG. The traumatic occlusion significantly increases the number of clastic cells, while the absence of occlusal forces retards the onset and the number of them. Early occlusal load should be avoided in the teeth subjected to immediate replantation.

Key words: Tooth replantation, Traumatic dental occlusion, Periodontal ligament.

Lista de Figuras

- Figura 1 Apresentação esquemática da técnica de Kvinnsland ..Página 84
(1991), para extração de molares de ratos.
- Figura 2 Quantificação no programa ImageJ do perímetro (a), ..Página 85
área de reabsorção (b), espessura do espaço do
ligamento periodontal (c), e área de anquilose (d).
- Figura 3 Apresentação do corte longitudinal do ligamento ..Página 86
periodontal no terço cervical da raiz mesial do primeiro
molar superior direito. A área avaliada está indicada
pelo retângulo. Barra= 25µm
- Figura 4 Quantificação no programa ImageJ da área de perfil ..Página 87
nuclear (a), matriz extracelular (b), substância amorfa
(c) e vasos sanguíneos (d).
- Figura 5 Fotomicrografia em microscopia de luz de corte ..Página 50
histológico longitudinal do primeiro molar superior
direito, corado pelo método da hematoxilina e eosina
(HE), mostrando os terços cervical (A-C), médio (B-B'')
e apical (C-C'') do periodonto da raiz mesial dos animais
dos grupos controle (GC), infra-oclusão (GIO) oclusão
traumática (GOT) com 3 dias de pós-operatório.

- Figura 6 Fotomicrografia em microscopia de luz de corte ..Página 58
histológico longitudinal do primeiro molar superior direito, corado pelo método da hematoxilina e eosina (HE), mostrando os terços cervical (A-C), médio (B-B'') e apical (C-C'') do periodonto da raiz mesial dos animais dos grupos controle (GC), infra-oclusão (GIO) oclusão traumática (GOT) com 5 dias de pós-operatório.
- Figura 7 Fotomicrografia em microscopia de luz de corte ..Página 60
histológico longitudinal do primeiro molar superior direito, corado pelo método da hematoxilina e eosina (HE), mostrando os terços cervical (A-C), médio (B-B'') e apical (C-C'') do periodonto da raiz mesial dos animais dos grupos controle (GC), infra-oclusão (GIO) oclusão traumática (GOT) com 7 dias de pós-operatório.
- Figura 8 Fotomicrografia em microscopia de luz de corte ..Página 62
histológico longitudinal do primeiro molar superior direito, corado pelo método da hematoxilina e eosina (HE), mostrando os terços cervical (A-C), médio (B-B'') e apical (C-C'') do periodonto da raiz mesial dos animais dos grupos controle (GC), infra-oclusão (GIO) oclusão traumática (GOT) com 14 dias de pós-operatório.
- Figura 9 Fotomicrografia em microscopia de luz de corte ..Página 64
histológico longitudinal do primeiro molar superior direito, corado pelo método da hematoxilina e eosina (HE), mostrando os terços cervical (A-C), médio (B-B'')

e apical (C-C'') do periodonto da raiz mesial dos animais dos grupos controle (GC), infra-oclusão (GIO) oclusão traumática (GOT) com 30 dias de pós-operatório.

Figura 10 Fotomicrografia em microscopia de luz de corte ..Página 67

histológico longitudinal do primeiro molar superior de animal do grupo controle (3 dias de pós-operatório), submetido à identificação da proteína TRAP através do método da imunoperoxidase indireta e contra-corado com hematoxilina. Em A observar uma vista panorâmica do primeiro molar superior exibindo a raiz mesial (fase distal) com suas subdivisões em terços. Em B-D são mostradas as células da linhagem osteoclásticas (macrófagos clásticos – células mononucleadas, setas em B; osteoclastos - células gigantes multinucleadas, setas em C-D). Notar que as imunomarcações são específicas e estrita ao citoplasma das células clásticas. Abreviaturas: LP, ligamento periodontal; OA, osso alveolar; VS, vasos sanguíneos.

Figura 11 Fotomicrografia em microscopia de luz de corte ..Página 68

histológico longitudinal do primeiro molar superior (raiz mesial – face distal) dos animais dos grupos controle (GC), infra-oclusão (GIO) e oclusão traumática (GOT) nos períodos experimentais de 3, 5 e 7 dias de pós-operatório, submetido à identificação da proteína TRAP

em osteoclastos (setas) através do método da imunoperoxidase indireta e contra-corado com hematoxilina. Notar que a quantidade de osteoclastos mostra um claro aumento (setas) nos animais dos grupos GC e GOT com 5 dias de pós-operatório. Além disso, os animais do grupo GOT mostra uma preponderância destas células em todos os períodos pós-operatórios. Abreviaturas: LP, ligamento periodontal; OA, osso alveolar; RD, raiz dentária mesial do primeiro molar superior.

Figura 12 Fotomicrografia em microscopia de luz de corte ..Página 69

histológico longitudinal do primeiro molar superior (raiz mesial – face distal) dos animais dos grupos controle (GC), infra-oclusão (GIO) e oclusão traumática (GOT) nos períodos experimentais de 14 e 30 dias de pós-operatório, submetido à identificação da proteína TRAP em osteoclastos (setas) através do método da imunoperoxidase indireta e contra-corado com hematoxilina. Notar que a quantidade de osteoclastos mostra uma clara diminuição nos grupos experimentais, persistindo (setas) no terço apical radicular dos grupos GC e GOT com 5 dias de pós-operatório. Abreviaturas: OA, osso alveolar; RD, raiz dentária mesial do primeiro molar superior; ta, terço apical; tm, terço médio.

Figura 13 Fotomicrografia em microscopia de luz de corte ..Página 71

histológico longitudinal do segundo molar superior de animal do grupo controle (GC), submetido à identificação da proteína citoqueratina (pan-queratina) (setas) através do método da imunoperoxidase indireta e contra-corado com hematoxilina. Notar que a imunorreatividade é citosólica e específica (setas). Em A é mostrada a imunomarcação do epitélio gengival; em B é mostrado o epitélio juncional (seta maior) e os restos epiteliais de Mallassez na junção dento-gengival (setas menores); em C é D são mostrados os restos epiteliais de Mallassez no ligamento periodontal (setas). Abreviaturas: EG, epitélio gengival; IC, inserção conjuntiva da junção dentogengival; LP, ligamento periodontal; OA, osso alveolar; RD, raiz dentária.

Figura 14 Fotomicrografia em microscopia de luz de corte ..Página 72

histológico longitudinal do primeiro molar superior de animais dos grupos controle (GC, A) e infra-oclusão (GIO, B) com 3 dias de pós-operatório e, grupo GC com 14 dias de pós-operatório (C), submetido à identificação da proteína citoqueratina (pan-queratina) (setas) através do método da imunoperoxidase indireta e contra-corado com hematoxilina. Notar em A (setas), a

presença de restos celulares apresentando imunorreatividade para citoqueratina; enquanto em B é possível observar alguns restos epiteliais de Mallassez exibindo discreta imunorreatividade (setas). Em C é mostrado alguns raros restos epiteliais de Mallassez, também exibindo discreta imunorreatividade granular citosólica (setas). Abreviaturas: LP, ligamento periodontal; RD, raiz dentária.

Lista de tabelas

- Tabela 1 Avaliação da espessura do ligamento periodontal.Página 51
- Tabela 2 Avaliação da porcentagem de área de matriz extracelular fibrilar.Página 52
- Tabela 3 Avaliação da porcentagem de área de matriz extracelular não fibrilar.Página 53
- Tabela 4 Avaliação da porcentagem de área de Vasos Sanguíneos.Página 54
- Tabela 5 Avaliação da quantidade de perfil nuclear.Página 55
- Tabela 6 Avaliação da quantidade de células clásticas.Página 56

Lista de Abreviaturas

GC- Grupo controle

GIO- Grupo infra-oclusão

GOT- Grupo oclusão traumática

VIP- Peptídeo intestinal vasoativo

TRAP- Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato

EGF- Fatores de crescimento epidermal

PBS- Tampão fosfato de sódio

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético

HE- Hematoxilina e eosina

EP- Erro padrão

Sumário

1. Introdução.....	33
2. Proposição.....	37
3. Material e Método.....	38
3.1 Animais	38
3.2 Grupos experimentais.....	39
3.3 Procedimentos cirúrgicos.....	40
3.4 Perfusão transcardíaca e processamento histológico.....	42
3.5 Imuno-histoquímica para identificação da TRAP e citoqueratina.....	44
3.6 Forma de análise dos resultados.....	46
3.6.1 Análise histológica.....	46
3.6.2 Análise histológica qualitativa e quantitativa.....	46
3.6.3 Análise histométrica – imunohistoquímica.....	47
3.6.4 Análise Estatística.....	47
4. Resultados.....	48
5. Discussão.....	73
6. Conclusão.....	77
7. Referências Bibliográficas.....	78
8. Anexos.....	84

1. Introdução

Os traumatismos dento-alveolares representam até 16% dentre os traumas faciais, sendo que a avulsão dentária acomete até 3% deste total (1-4). A avulsão dentária é o traumatismo mais grave que pode acometer o elemento dentário. A etiologia das avulsões são as práticas desportivas, acidentes ciclísticos, quedas da própria altura, agressão física, acidentes automobilísticos e perda de consciência (5-10). O melhor tratamento é o reimplante imediato; entretanto, quando a reimplantação do dente é realizada de forma tardia as chances de sucesso diminuem, devido a morte das células do ligamento periodontal. Portanto, o reimplante deve ser realizado imediatamente após o trauma, pelo próprio acidentado ou acompanhante, no local do acidente (7,11,12). Fatores como outros traumas corporais ou faciais e falta de acesso imediato ao cirurgião dentista podem limitar o protocolo de atendimento clínico ideal (11,12).

Dentre os fatores que podem interferir no prognóstico do reimplante imediato temos a fase de rizogênese dental, o período extra-alveolar, os meios de conservação, o tipo de manipulação dental, a contaminação, o uso e o tipo de contenção dental realizado (10,13,14) e a oclusão traumática.

A oclusão traumática pode estar relacionada nesses casos a fatores já existentes anteriormente a avulsão ou esse passa a ocorrer em decorrência de fatores relacionados ao acidente. O contato prematuro, bruxismo, apertamento dental e a oclusão deficiente, destacando-se a presença de contatos prematuros, são considerados os fatores preexistentes mais comuns encontrados. Dentre os fatores relacionados ao traumatismo dento-facial que podem alterar a oclusão, destaca-se, o incorreto posicionamento do dente no alvéolo, mal posicionamento após o deslocamento dos ossos faciais nos casos de fraturas, luxações dos côndilos,

deslocamento patológico do disco ou edema das articulações temporomandibulares (15).

O ligamento periodontal é responsável pela homeostase do periodonto, uma vez que exerce as funções de suporte dental, propriocepção, nutrição, além das propriedades regenerativas. As funções de homeostasia e reparo são as mais significantes no processo de reimplante dental, que ocorrem através da regulação de fatores de crescimento e diferenciação celular (16,17). A regeneração através da proliferação e apoptose celular ocorre em diferentes padrões e tempos para o restabelecimento do espaço do ligamento periodontal após o reimplante (18).

O estímulo oclusal é importante fator para remodelação óssea e estabelecimento do espaço do ligamento periodontal, através da interação entre diferentes células (16,19,20,21). A função oclusal favorável é considerada um estímulo necessário para a manutenção da homeostasia dos tecidos periodontais, através da sua estimulação mecânica (22,23). Já a falta ou o excesso de forças oclusais resultam na desarmonia do funcionamento dos tecidos periodontais (23).

O excesso de carga oclusal ocasiona alterações morfofuncionais como a desorientação e a diminuição das fibras colágenas (24,25), a alteração no alinhamento das fibras periodontais (26,27), o aumento do número de fibroblastos (24), o aumento da atividade osteoclástica e a reorganização do osso alveolar (14-16), a trombose venosa (24) e a necrose do ligamento periodontal (26). Estudos demonstraram que a oclusão traumática em ratos resulta em um aumento da pressão do fluido intersticial do ligamento periodontal (48 horas após a indução do trauma) (24), diminuição do espaço do ligamento periodontal até o 5º dia, tendo sua espessura regularizada no 7º dia (28), provavelmente em virtude da perda óssea necessária para esse processo de remodelação (22).

Estudos que compararam grupos com contato dental sem alteração oclusal e sem contato dental após transplante (29) ou reimplante dental (17,30) mostraram que a ausência de contato dental provoca anquilose (15 dias) (29,30), diminuição do espaço do ligamento periodontal (29-31), diminuição na formação de osteoclastos e aumento de osteoblastos e (17); diminuição da presença do peptídeo intestinal vasoativo (VIP) (17), redução no fator de crescimento de fibroblastos (30) e redução na expressão de periostina (23).

Para estudar os mecanismos dinâmicos envolvidos no processo de reparo celular do reimplante dentário, como a influência da carga oclusal, a técnica de imuno-histoquímica é uma ferramenta metodológica que pode auxiliar na compreensão e justificativa dos fatos evidenciados. O complexo mecanismo para regular a regeneração e homeostasia do ligamento periodontal, provavelmente deve conseguir explicar dois tipos diferentes de mecanismos regulatórios; sendo o mecanismo de calcificação para produção de osso e outro de não calcificação para manter um espaço fixo do ligamento periodontal (16). A proteína fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) também tem um papel importante no processo de avaliação da dinâmica de remodelação óssea e reabsorção, sendo um excelente marcador das células da linhagem osteoclástica (32,33). A avaliação dos restos epiteliais de Malassez também é importante, uma vez que são responsáveis pela formação manutenção da formação de cemento acelular e pela constante liberação de fatores de crescimento epidermal (EGF), que, por proximidade, induzem a reabsorção da superfície óssea alveolar periodontal, mantendo o espaço periodontal humano com medidas que variam entre 0,20 e 0,40mm de espessura (34-39). Deste modo, o estudo imuno-histoquímico do efeito da oclusão traumática no processo de

reparo de reimplantes imediatos mostra-se complementar às avaliações histológicas de rotina.

2. Proposição

Este estudo visou avaliar a influência da oclusão dentária em ratos submetidos a reimplante imediato, com ênfase nas características histológicas do processo de reparo do periodonto nos terços cervical, médio e apical da raiz mesial do primeiro molar superior e avaliações imuno-histoquímica dos restos epiteliais de Malassez e células clásticas.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Este estudo seguiu as normas estabelecidas pelo “Canadian Council on Animal Care – Guide to the Care and Use of Experimental Animals”, e os protocolos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia e Medicina Veterinária de Araçatuba (UNESP) número 2010-05125.

Os animais selecionados para este estudo foram ratos (n=150), machos, Wistar (*Rattus norvegicus*) com 5 semanas de vida pós-natal, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (UNESP). Estes animais foram transferidos para o Biotério de manutenção do Departamento Cirurgia e Clínica Integrada da Odontologia de Araçatuba (UNESP), cinco dias antes do experimento para aclimatização. Os animais foram acondicionados em gaiolas, cada uma com cinco animais, alimentados com ração granulada e água *ad libitum* e mantidos sob ciclo de claro/escuro de 12/12 horas a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $50\pm 10\%$ de umidade relativa.

3.2. Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em três grupos de 50 animais cada (n=50). Cada grupo de animais foi subdividido em 5 períodos pós-operatório (3 dias, 5 dias, 7 dias, 14 dias e 30 dias), cada um destes constituído com 10 animais (n=10). As intervenções recebidas pelos grupos foram:

- A) GC, reimplante dental imediato no primeiro molar superior direito, sem alteração no primeiro molar inferior direito; ou seja, sem alteração oclusal intencional;

- B) GIO, reimplante dental imediato no primeiro molar superior direito e desgaste da face oclusal do primeiro molar inferior até que seja eliminado completamente o contato com o dente antagonista;

- C) GOT, reimplante dental imediato no primeiro molar superior direito e, a face oclusal do primeiro molar inferior foi preenchida com resina composta, até a altura das pontas das cúspides.

3.3. Procedimentos cirúrgicos

Inicialmente, os animais foram anestesiados, através de injeção intramuscular (i.m.) de solução constituída de cloridrato de ketamina (25 mg/kg, Vetanarcol, Laboratórios König, Argentina) e xilazina (10 mg/kg, Coopazine, Coopers Brasil, Brasil).

Os animais dos grupos GIO e GOT receberam os seguintes tratamentos antes da cirurgia: GIO, redução da superfície oclusal do primeiro e segundo molares inferiores direito com broca diamantada em alta rotação e irrigação abundante, até que fosse eliminado todo o contato com o dente antagonista, sem provocar exposição pulpar; GOT, a superfície oclusal do primeiro molar inferior direito foi aumentada com restauração direta de resina composta. Antes de serem feitas as restaurações oclusais, foram realizadas microretenções com broca Carbide FG ¼ (Beavers Dental, Canada) em caneta de alta rotação com irrigação. A restauração oclusal foi realizada utilizando-se ácido fosfórico a 37% (FGM, Brasil) em esmalte e dentina, microbrush (Microbrush® International, Grafton, EUA); adesivo scotchbond multi-purpose (3M ESPE, Saint Paul, EUA), resina composta Estelite e Quick (Tokuyama Dental Corp, Japão) e fotopolimerizador (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, Brasil), como indicado pelo fabricante. Deste modo, uma superfície oclusal plana foi confeccionada na altura das cúspides.

Para os procedimentos de reimplante dentário, os animais foram imobilizados em uma mesa cirúrgica apropriada para cirurgia bucal, sendo realizada a anti-sepsia da porção anterior e posterior das maxilas com polivinilpirrolidona-iodo (Riodeine - Ind. Farmac. Rioquímica Ltda), utilizando a metodologia de kvinnslund (1991) (Figura 1) (40). A sindesmotomia, a luxação e a avulsão do primeiro molar

superior direito foi realizada com auxílio de instrumental especialmente adaptado. Os dentes avulsionados foram imediatamente reposicionados no alvéolo para todos os grupos experimentais.

Após os procedimentos cirúrgicos, todos os animais receberam uma dose única de antibiótico via intramuscular (benzatina benzilpenicilina – 12.000 IU, procaina benzilpenicilina – 6.000 IU, benzilpenicilina potássica – 6.000 IU, sulfato de dihidroestreptomicina - 5mg, Fort Dodge, Animal Health Ltda., Campinas, SP, Brasil).

Foram excluídos os animais que tiveram morte natural, dentes com extrusão parcial ou total e/ou que perderam as restaurações realizadas durante o período experimental.

3.4 Perfusão transcardíaca e processamento histológico

Para a perfusão transcardíaca, os animais foram anestesiados com dose letal de solução de xilazina e ketamina e posicionados em uma mesa cirúrgica em decúbito dorsal. A cavidade torácica foi exposta e uma solução heparinizada (0,1 ml / 5.000 U.I/ml) foi injetada no ventrículo direito. Decorridos aproximadamente 10 segundos, os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca, via aorta, inicialmente com solução salina a 0,9% (100 ml), seguido de solução fixadora (400 ml) de solução de formaldeído (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) a 4% em tampão fosfato de sódio (PBS) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) a 0,1 M, pH 7,4 a 4°C. As maxilas foram imediatamente dissecadas e pós-fixadas na mesma solução fixadora durante 24 horas a 4°C. Em prosseguimento, os espécimes foram lavados em PBS, submetidos à descalcificação em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 10% em PBS, 0,1M, pH 7,4, durante 20 dias. Após este período, os espécimes foram lavados exaustivamente em água corrente durante 12 horas e submetidas ao processamento histológico para inclusão em parafina.

Os espécimes foram desidratados em soluções crescentes de álcoois, diafanizadas em xilóis, impregnadas em parafina de baixa temperatura de fusão (56-58C, Histoseck, Merck, EUA) durante 3 horas e inclusas com orientação pré-estabelecida e padronizada. Os cortes histológicos sagitais com 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo automático (Leica SMR 2000, EUA). A partir de cada espécime, foram coletados 15 cortes histológicos distribuídos em cinco lâminas histológicas (n=2 para técnica de coloração em HE (Hematoxilina e Eosina); n=3, para a técnica imuno-histoquímica). Os cortes histológicos submetidos para a técnica imuno-histoquímica foram coletados em lâminas adesivas (Starfrost Advanced

Adhesive, Knittel Glaser, Alemanha), enquanto os demais cortes histológicos foram coletados em lâminas comuns revestida com poli-lisina, secos a temperatura ambiente durante 24 horas e transferidos para estufa a 37°C.

Para o método de coloração em HE, as lâminas histológicas foram diafanizadas em banhos de xilóis, reidratadas em solução decrescente de álcoois, lavadas em água corrente e coradas em soluções aquosas de hematoxilina de Harris e eosina-floxina. Em seguida, as lâminas histológicas foram lavadas em água corrente, desidratadas em soluções crescente de álcoois, diafanizadas em xilóis e protegidas com meio de montagem Permount (Fisher Scientific, USA) e lamínulas de vidro.

3.5 Imuno-histoquímica para identificação da TRAP e citoqueratina pelo método da imunoperoxidase indireta

Os cortes histológicos foram submetidos a banhos sucessivos de xilol, reidratados em soluções decrescentes de álcoois e lavados em água destilada. Em seguida, submetidos às seguintes etapas de lavagens e incubações sob agitação a 20 rpm, descritas resumidamente: a) duas lavagens de 10 minutos em PBS, acrescido de 0,03% de triton x-100 (Sigma, CA, EUA) a temperatura ambiente; b) recuperação antigênica com solução de 1% de tampão citrato pH 6.0 (100x citrate buffer, Spring Bioscience, CA, EUA) em calor úmido em câmara pressurizada (Decloaking Chamber, Biocare Medical, CA, EUA), com programação de 95°C por 5 minutos, 70°C por 30 minutos e esfriamento à temperatura ambiente durante 90 minutos; c) lavagens em PBS acrescido de Triton x-100; d) inibição da peroxidase endógena com 10% de H₂O₂ por 30 minutos em metanol; e) lavagens em PBS; e) bloqueio de marcações inespecíficas, inicialmente com PBS/Triton x-100 e 5% de leite em pó desnatado (Molico, Nestle, SP, Brasil), durante 1 hora, lavagens em PBS, seguido do bloqueio final com PBS/Triton x-100 acrescido de 5% de albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich, MO, EUA) à temperatura ambiente; f) Lavagens em PBS e PBS/Triton x-100; g) incubação por 24 horas em câmara úmida à temperatura ambiente, com um dos seguintes anticorpos primários, anti-TRAP (1:500, K-17, sc-30833, lote #D1613, anticorpo policlonal obtido em cabra, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) ou pan-citoqueratina (1:100, AE1/ AE3, sc-81714, lote #J1612, monoclonal anticorpo obtido em camundongo, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), diluídos em PBS/Triton X-100 acrescido de BSA; h) duas lavagens em PBS a temperatura ambiente; i) incubação por 1 hora, em uma solução contendo anticorpo secundário biotilado universal obtido

em suíno (LSAB kit, K0679, Dako laboratories, EUA), diluído em PBS/Triton X-100 acrescido de BSA; j) duas lavagens em PBS a temperatura ambiente; l) incubação por 1 hora, com o complexo avidina-biotina peroxidase (LSAB kit, K0679, Dako Laboratories, EUA) em PBS à temperatura ambiente; m) duas lavagens em PBS à temperatura ambiente; n) revelação com uma solução de incubação contendo diaminobenzidina e intensificadores (LSAB kit, K0679, Dako laboratories); o), inibição da reação com lavagens em água destilada seguido de lavagens em PBS. Em seguida, as lâminas histológicas foram desidratadas em soluções crescentes de alcoóis, diafanizadas em xilol e protegidas com meio de montagem (Permount, Fisher Scientific, CA, EUA) e lamínulas de vidro.

3.6 Forma de análise dos resultados

3.6.1-Análise histológica

Os cortes histológicos foram analisados em microscopia de campo claro (Microscópio Aristoplan, Leica - Aristoplan, Alemanha) acoplado a uma câmera digital AxioCam MRc (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Alemanha). Os campos visuais da maxila de cada animal foram coletados com objetivas de 20x e 40x através do programa de software Axiovision Rel 4.0 (Carl Zeiss, GmbH, Alemanha), alterando as variáveis de brilho e contraste de modo a realçar as células e tecidos. Foram analisadas as características do ligamento periodontal nos terços cervical, médio e apical.

3.6.2 Análise histológica qualitativa e quantitativa

Para a análise dos resultados, os eventos considerados para a análise histológica descritiva foram aqueles relacionados à organização do ligamento periodontal, tais como a disposição e maturação das fibras colágenas, presença de células inflamatórias, presença de células clásticas nas superfícies radiculares e óssea e organização dos vasos sanguíneos. Com relação à análise quantitativa, foram consideradas porcentagem de vasos sanguíneos, substância amorfa (matriz extracelular não fibrilar), matriz extracelular fibrilar (fibras colágenas), perfil nuclear (perfis de células exibindo núcleo) e a espessura do ligamento periodontal (Figura 2,3 e 4 no Anexo A).

3.6.3 Análise histométrica - Imuno-histoquímica

As imagens foram processadas no programa de análise de imagens ImageJ (National Institutes of Health NIH, Bethesda, Maryland, EUA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016) para mensuração da área analisada em micrometros (μm^2) e número de células que exibem imunorreatividade para a TRAP na área pré-determinada; no ligamento periodontal, osso ou superfície dental; conforme o caso em estudo.

3.6.4- Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 21.0.0. Os dados foram submetidos ao teste Kruskal-Wallis post hoc Dunn, para comparação entre os grupos e entre os terços radiculares avaliados, considerando $p < 0.05$ como significante.

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISE HISTOLÓGICA

A análise histopatológica foi subdividida em qualitativa e quantitativa. Na análise quantitativa foram avaliadas a espessura do ligamento periodontal, número de perfil nuclear, além das porcentagens de matriz extracelular fibrilar, não fibrilar e vasos sanguíneos (Tabelas 1-5).

4.1.1. Período de 3 dias pós-operatório

Ao terceiro dia experimental, a espessura do ligamento periodontal apresentou uma redução nos grupos GIO e GOT em relação GC (Figura 5) (Tabela 1). Todos os grupos experimentais neste período (controle, infra-oclusão e oclusão traumática) mostraram áreas de remodelação da matriz extracelular fibrilar (fibras colágenas), com hialinização (matriz extracelular não fibrilar) na região central do ligamento periodontal e presença de fibras colágenas com discreta espessura sem orientação nítida (Figura 5); sendo que a maior quantidade de fibras colágenas foi vista na porção média e apical da raiz dos grupos GIO e GOT (Tabela 2 e 3). Áreas inflamatórias foram mais visíveis nos animais dos grupos controle e oclusão traumática (Figura 5A; 5C); além disso, áreas com lesão vascular e extravasamento plasmático persistiam em todos os terços radiculares nos animais do grupo oclusão traumática (Figura 5C-C''). Vasos sanguíneos dilatados se destacavam nas áreas com processo inflamatório, assim como próximo do osso alveolar (Figura 5) (Tabela 4). O número de perfil nuclear foi significativamente maior no grupo GIO, no terço médio da raiz (Tabela 5). Osteoclastos estavam presentes, principalmente, na superfície do osso alveolar e nos espaços medulares associados ao ligamento periodontal e, raramente, na superfície radicular em todos os grupos experimentais, em um número significativamente maior no grupo GOT, nos três terços radiculares (Tabela 6).

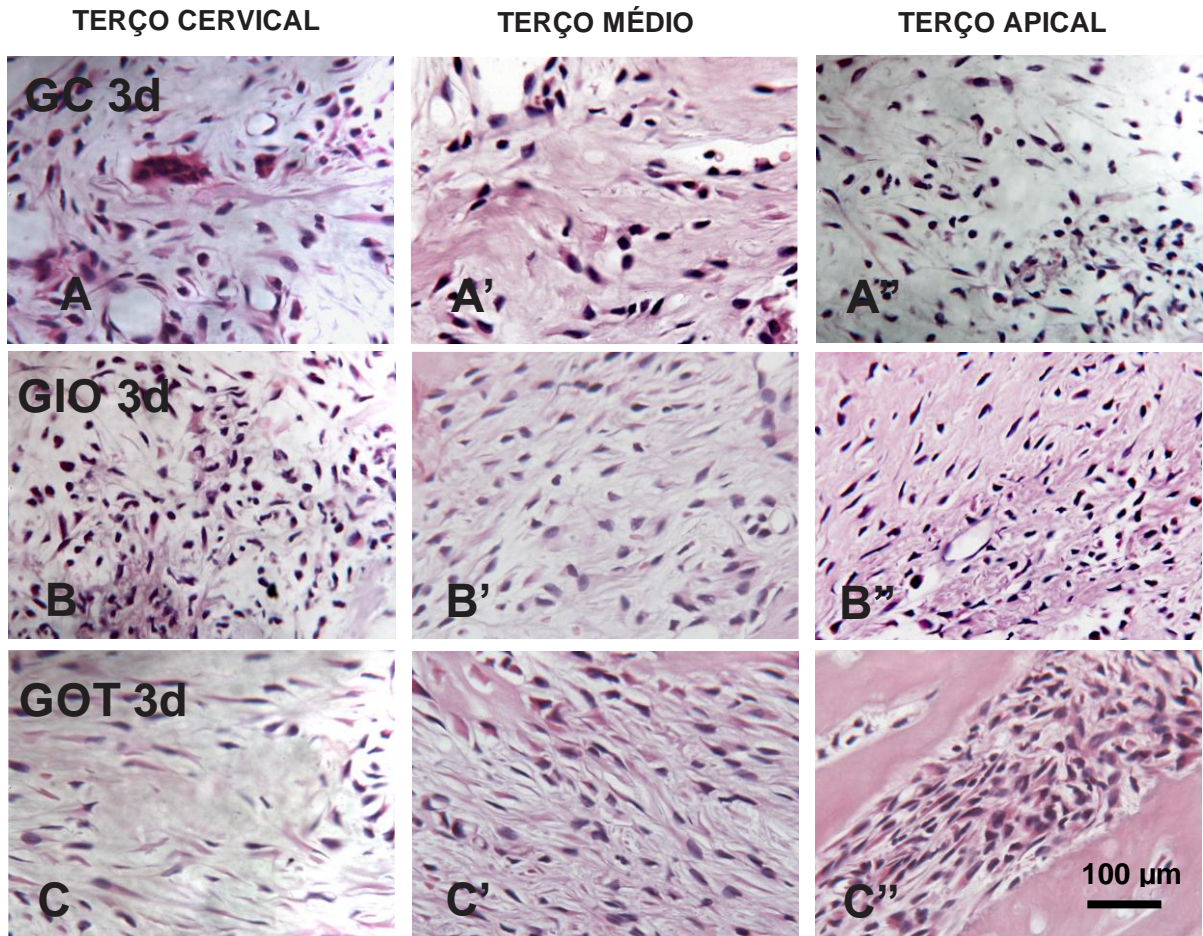


Figura 5. Fotomicrografia em microscopia de luz de corte histológico longitudinal do primeiro molar superior direito, corado pelo método da hematoxilina e eosina (HE), mostrando os terços cervical (A-C), médio (B-B'') e apical (C-C'') do periodonto da raiz mesial dos animais dos grupos controle (GC), infra-oclusão (GIO), oclusão traumática (GOT) com 3 dias de pós-operatório.

Tabela 1. Avaliação da espessura do ligamento periodontal.

GRUPOS		OCLUSÃO CONTROLE		INFRA-OCLUSÃO		OCLUSÃO TRAUMÁTICA	
PERÍODOS	Espessura do ligamento periodontal	Média (µm)	EP	Média (µm)	EP	Média (µm)	EP
3°	Cervical	336,0 ^{Aa}	30,4	368,0 ^{Aa}	100,9	377,0 ^{Aa}	46,5
	Médio	289,8 ^{Aa}	43,5	170,3 ^{Ba}	17,3	200,0 ^{ABa}	21,7
	Apical	329,8 ^{Aa}	96,6	227,0 ^{Aa}	13,4	244,0 ^{Aa}	22,9
5°	Cervical	394,0 ^{Aa}	39,6	196,0 ^{Ba}	8,2	348,0 ^{ACa}	39,4
	Médio	236,2 ^{Aa}	21,0	166,5 ^{Aa}	26,3	223,6 ^{Aa}	16,9
	Apical	270,0 ^{Aa}	46,0	226,5 ^{Aa}	38,6	264,6 ^{Aa}	12,8
7°	Cervical	421,5 ^{Aa}	100,8	578,5 ^{Aa}	216,6	353,5 ^{Aa}	52,9
	Médio	195,3 ^{Aa}	29,0	243,8 ^{Aa}	86,5	215,3 ^{Aa}	24,5
	Apical	297,3 ^{Aa}	52,2	386,0 ^{Aa}	81,3	292,0 ^{Aa}	13,1
14°	Cervical	241,0 ^{Aa}	83,1	116,0 ^{Aa}	67,3	225,1 ^{Aa}	82,1
	Médio	155,4 ^{Aa}	26,3	86,30 ^{Aa}	44,1	126,6 ^{Aa}	17,4
	Apical	213,0 ^{Aa}	52,8	184,7 ^{Aa}	64,9	114,7 ^{Aa}	37,4
30°	Cervical	360,4 ^{Aa}	182,4	230,1 ^{Aa}	88,5	345,0 ^{Aa}	199
	Médio	290,6 ^{Aa}	163,0	154,0 ^{Aa}	35,6	262,2 ^{Aa}	163,7
	Apical	284,8 ^{Aa}	123,8	241,1 ^{Aa}	56,7	201,0 ^{Aa}	104,6

Os valores absolutos foram submetidos à avaliação estatística pelo método Kruskal-Wallis e Dunn post hoc teste, considerar $p < 0,05$ como significativo. Letra maiúscula é a diferença entre os grupos e letra minúscula é a diferença entre os terços.

Tabela 2. Avaliação da porcentagem de área de matriz extracelular fibrilar.

GRUPOS		OCLUSÃO CONTROLE		INFRA-OCLUSÃO		OCLUSÃO TRAUMÁTICA	
PERÍODOS	Área de Matriz Extracelular Fibrilar	Média (%)	EP	Média (%)	EP	Média (%)	EP
3°	Cervical	51,50 ^{Aa}	4,9	45,50 ^{Aa}	3,6	45,50 ^{Aa}	3,4
	Médio	58,10 ^{Aa}	7,5	63,70 ^{Ab}	4,3	70,70 ^{Ab}	2,5
	Apical	59,70 ^{Aa}	4,9	62,00 ^{Ab}	2,0	67,30 ^{Ab}	1,3
5°	Cervical	45,00 ^{Aa}	2,3	50,00 ^{Aa}	2,6	41,20 ^{Aa}	2,2
	Médio	64,60 ^{Ab}	2,4	57,30 ^{Aa}	2,1	57,30 ^{Ab}	2,6
	Apical	68,80 ^{Aa}	1,6	58,90 ^{Ba}	3,3	60,36 ^{ABb}	1,3
7°	Cervical	41,50 ^{Aa}	2,5	46,50 ^{Aa}	3,5	49,00 ^{Aa}	1,5
	Médio	57,70 ^{Aa}	4,5	53,00 ^{Aa}	3,4	58,10 ^{Aa}	1,5
	Apical	53,80 ^{Aa}	0,2	55,50 ^{Aa}	2,6	56,90 ^{Aa}	0,8
14°	Cervical	46,50 ^{Aa}	2,9	42,00 ^{Aa}	3,6	37,50 ^{Aa}	1,5
	Médio	60,20 ^{Aa}	1,5	59,30 ^{Aa}	9,0	55,00 ^{Aa}	9,0
	Apical	60,10 ^{Aa}	1,5	54,20 ^{Aa}	6,1	52,50 ^{Aa}	11,0
30°	Cervical	48,70 ^{Aa}	1,2	45,00 ^{Aa}	1,6	48,00 ^{Aa}	2,0
	Médio	54,40 ^{Aa}	5,4	55,40 ^{Aa}	1,8	52,70 ^{Aa}	0,4
	Apical	59,70 ^{Aa}	1,3	52,50 ^{Aa}	3,6	57,30 ^{Aa}	5,7

Os valores absolutos foram submetidos à avaliação estatística pelo método Kruskal-Wallis e Dunn post hoc teste, considerar $p < 0,05$ como significante. Letra maiúscula é a diferença entre os grupos e letra minúscula é a diferença entre os terços.

Tabela 3. Avaliação da porcentagem de área de matriz extracelular não fibrilar.

GRUPOS		OCLUSÃO CONTROLE		INFRA-OCLUSÃO		OCLUSÃO TRAUMÁTICA	
PERÍODOS	Área de Matriz Extracelular Não Fibrilar	Média (%)	EP	Média (%)	EP	Média (%)	EP
3°	Cervical	16,25 ^{Aa}	2,4	16,25 ^{Aa}	2,2	35,60 ^{Ba}	3,7
	Médio	16,50 ^{Aa}	0,5	19,70 ^{Aa}	1,5	37,00 ^{Ba}	2,5
	Apical	12,80 ^{Aa}	1,5	21,30 ^{ABa}	2,9	28,50 ^{Ba}	4,2
5°	Cervical	21,50 ^{ABa}	3,1	6,70 ^{Aa}	1,2	38,70 ^{Ba}	2,8
	Médio	33,80 ^{Aa}	2,9	12,30 ^{Aa}	0,3	58,00 ^{Ba}	10,4
	Apical	48,30 ^{Aa}	5,6	18,00 ^{ABa}	3,2	75,70 ^{ACa}	3,0
7°	Cervical	12,30 ^{ABa}	1,3	4,70 ^{Aa}	0,9	28,00 ^{Ba}	3,6
	Médio	21,70 ^{Aa}	1,9	8,00 ^{Aa}	1,0	37,00 ^{Ba}	6,9
	Apical	43,70 ^{Aa}	4,0	11,30 ^{ABa}	2,9	56,30 ^{ACa}	11,7
14°	Cervical	10,20 ^{Aa}	1,6	8,00 ^{Aa}	1,0	11,00 ^{Aa}	2,5
	Médio	11,80 ^{Aa}	1,4	9,00 ^{Aa}	1,1	12,00 ^{Aa}	0,6
	Apical	31,17 ^{Aa}	6,2	30,10 ^{Aa}	1,9	18,00 ^{Aa}	2,5
30°	Cervical	9,50 ^{Aa}	1,8	7,60 ^{Aa}	1,2	7,50 ^{Aa}	1,5
	Médio	11,50 ^{Aa}	1,8	5,30 ^{Aa}	0,3	13,00 ^{Aa}	2,0
	Apical	19,70 ^{Aa}	3,5	13,00 ^{ABa}	1,7	45,50 ^{ACa}	0,5

Os valores absolutos foram submetidos à avaliação estatística pelo método Kruskal-Wallis e Dunn post hoc teste, considerar $p < 0,05$ como significativo. Letra maiúscula é a diferença entre os grupos e letra minúscula é a diferença entre os terços.

Tabela 4. Avaliação da porcentagem de área de Vasos Sanguíneos.

GRUPOS		OCLUSÃO CONTROLE		INFRA-OCLUSÃO		OCLUSÃO TRAUMÁTICA	
PERÍODOS	% de Vasos Sanguíneos	Média (%)	EP	Média (%)	EP	Média (%)	EP
3°	Cervical	3,00 ^{Aa}	0,9	7,25 ^{Ba}	0,2	4,25 ^{Aa}	0,6
	Médio	4,40 ^{Aa}	2,0	5,65 ^{Aa}	0,75	6,15 ^{Aa}	1,1
	Apical	6,50 ^{Aa}	0,95	6,20 ^{Aa}	1,7	6,00 ^{Aa}	1,2
5°	Cervical	6,25 ^{Aa}	1,1	5,00 ^{Aa}	0,7	7,70 ^{Aa}	1,9
	Médio	6,03 ^{Aa}	1,4	4,43 ^{Aa}	0,8	9,09 ^{Aa}	2,4
	Apical	9,75 ^{Aa}	3,2	10,5 ^{Aa}	3,1	12,0 ^{Aa}	3,3
7°	Cervical	8,00 ^{Aa}	2,0	8,50 ^{Ba}	3,5	9,50 ^{Ba}	0,9
	Médio	6,37 ^{Aa}	2,8	6,61 ^{Aa}	3,9	8,34 ^{Aa}	0,5
	Apical	16,0 ^{Aa}	7,0	9,50 ^{Aa}	2,5	15,0 ^{Ab}	1,7
14°	Cervical	10,5 ^{Aa}	0,9	4,30 ^{Aa}	0,9	4,00 ^{Aa}	3,0
	Médio	7,30 ^{Aa}	1,2	5,33 ^{Aa}	2,5	4,40 ^{Aa}	1,6
	Apical	12,0 ^{Aa}	1,2	10,7 ^{Aa}	2,6	8,50 ^{Aa}	1,5
30°	Cervical	4,67 ^{Aa}	3,1	4,50 ^{Aa}	1,7	5,75 ^{Aa}	1,8
	Médio	7,65 ^{Aa}	4,1	11,54 ^{Ab}	1,1	9,30 ^{Aa}	1,8
	Apical	6,30 ^{Aa}	2,3	13,25 ^{Aa}	1,1	13,5 ^{Aa}	3,0

Os valores absolutos foram submetidos à avaliação estatística pelo método Kruskal-Wallis e Dunn post hoc teste, considerar $p < 0,05$ como significativo. Letra maiúscula é a diferença entre os grupos e letra minúscula é a diferença entre os terços.

Tabela 5. Avaliação da quantidade de perfil nuclear.

GRUPOS		OCLUSÃO CONTROLE		INFRA-OCLUSÃO		OCLUSÃO TRAUMÁTICA	
Períodos	Perfil Nuclear	Média (%)	EP	Média (%)	EP	Média (%)	EP
3°	Cervical	134,80 ^{Aa}	31,3	151,80 ^{Aa}	13,3	126,00 ^{Aa}	16,0
	Médio	120,50 ^{Aa}	14,7	175,60 ^{ABa}	19,8	95,70 ^{ACa}	14,6
	Apical	156,80 ^{Aa}	29,1	149,80 ^{Aa}	23,9	146,30 ^{Aa}	4,4
5°	Cervical	131,00 ^{Aa}	16,7	143,30 ^{Aa}	2,0	119,00 ^{Aa}	12,3
	Médio	137,30 ^{ABa}	5,1	129,50 ^{Aa}	6,1	103,50 ^{ACa}	7,4
	Apical	172,30 ^{Aa}	26,0	138,80 ^{Aa}	11,6	118,50 ^{Aa}	4,4
7°	Cervical	145,00 ^{Aa}	6,0	163,00 ^{Aa}	15,0	176,30 ^{Aa}	14,8
	Médio	139,50 ^{Aa}	12,5	121,00 ^{Aa}	5,0	144,00 ^{Aa}	10,5
	Apical	163,00 ^{Aa}	41,0	151,00 ^{Aa}	33,0	170,50 ^{Aa}	6,2
14°	Cervical	175,00 ^{Aa}	13,6	132,30 ^{Aa}	30,5	184,50 ^{Aa}	29,5
	Médio	146,30 ^{Aa}	10,9	116,70 ^{Aa}	24,7	132,50 ^{Aa}	4,5
	Apical	188,80 ^{Aa}	10,5	116,70 ^{Aa}	24,7	132,50 ^{Aa}	4,5
30° *	Cervical	111,30 ^{Aa}	8,4	139,30 ^{Ba}	5,2	127,50 ^{ABa}	5,6
	Médio	123,70 ^{Aa}	15,7	139,30 ^{Aa}	5,2	106,00 ^{Aa}	9,6
	Apical	115,00 ^{Aa}	9,2	164,30 ^{Aa}	15,4	120,80 ^{Aa}	9,7

Os valores absolutos foram submetidos à avaliação estatística pelo método Kruskal-Wallis e Dunn post hoc teste, considerar $p < 0,05$ como significante. Letra maiúscula é a diferença entre os grupos e letra minúscula é a diferença entre os terços.

Tabela 6. Avaliação da quantidade de células clásticas.

GRUPOS		OCLUSÃO CONTROLE		INFRA-OCLUSÃO		OCLUSÃO TRAUMÁTICA	
Períodos	TRAP	Média (%)	EP	Média (%)	EP	Média (%)	EP
3°	Cervical	16,25 ^{Aa}	2,4	16,25 ^{Aa}	2,2	35,60 ^{Ba}	3,7
	Médio	16,50 ^{Aa}	0,5	19,70 ^{Aa}	1,5	37,00 ^{Ba}	2,5
	Apical	12,80 ^{Aa}	1,5	21,30 ^{ABa}	2,9	28,50 ^{Ba}	4,2
5°	Cervical	21,50 ^{ABa}	3,1	6,70 ^{Aa}	1,2	38,70 ^{Ba}	2,8
	Médio	33,80 ^{Aa}	2,9	12,30 ^{Aa}	0,3	58,00 ^{Ba}	10,4
	Apical	48,30 ^{Aa}	5,6	18,00 ^{ABa}	3,2	75,70 ^{ACa}	3,0
7°	Cervical	12,30 ^{ABa}	1,3	4,70 ^{Aa}	0,9	28,00 ^{Ba}	3,6
	Médio	21,70 ^{Aa}	1,9	8,00 ^{Aa}	1,0	37,00 ^{Ba}	6,9
	Apical	43,70 ^{Aa}	4,0	11,30 ^{ABa}	2,9	56,30 ^{ACa}	11,7
14°	Cervical	10,20 ^{Aa}	1,6	8,00 ^{Aa}	1,0	11,00 ^{Aa}	2,5
	Médio	11,80 ^{Aa}	1,4	9,00 ^{Aa}	1,1	12,00 ^{Aa}	0,6
	Apical	31,17 ^{Aa}	6,2	30,10 ^{Aa}	1,9	18,00 ^{Aa}	2,5
30°	Cervical	9,50 ^{Aa}	1,8	7,60 ^{Aa}	1,2	7,50 ^{Aa}	1,5
	Médio	11,50 ^{Aa}	1,8	5,30 ^{Aa}	0,3	13,00 ^{Aa}	2,0
	Apical	19,70 ^{Aa}	3,5	13,00 ^{ABa}	1,7	45,50 ^{ACa}	0,5

Os valores absolutos foram submetidos à avaliação estatística pelo método Kruskal-Wallis e Dunn post hoc teste, considerar $p < 0,05$ como significante. Letra maiúscula é a diferença entre os grupos e letra minúscula é a diferença entre os terços.

Período de 5 dias pós-operatório

A espessura do ligamento periodontal sofreu uma redução no grupo GIO e um aumento nos grupos GC e GOT, ambos significativos (Tabela 1). A matriz extracelular fibrilar exibiu características de processo de organização das fibras colágenas, sendo estas mais espessas e com orientação mais definida, principalmente no grupo infra-oclusão (Figura 6B-B’), embora haja uma redução na área de matriz extracelular fibrilar na porção apical da raiz deste quando comparado ao grupo GC (Tabela 2). Por outro lado, as fibras colágenas ainda não exibiram clara orientação nos grupos controle e oclusão traumática (Figura 6A-A’; C-C’). Áreas apresentando rica rede vasos sanguíneos, alguns dilatados, foram, principalmente, visíveis no terço apical dos grupos controle, oclusão traumática (Figura 6A-A’; C-C’) e infra-oclusão (Tabela 4). O perfil nuclear do grupo GOT mantém-se significativamente reduzido, e o grupo GIO apresenta uma redução significativa em relação ao grupo GC, mas não em relação ao grupo GOT (Tabela 5). A presença de células clásticas na superfície radicular foi intensa em todos os terços do ligamento periodontal, tanto nas superfícies radicular e do osso alveolar, principalmente nos grupos controle e oclusão traumática (Figura 6) e reduzida no grupo infra-oclusão (Tabela 6).

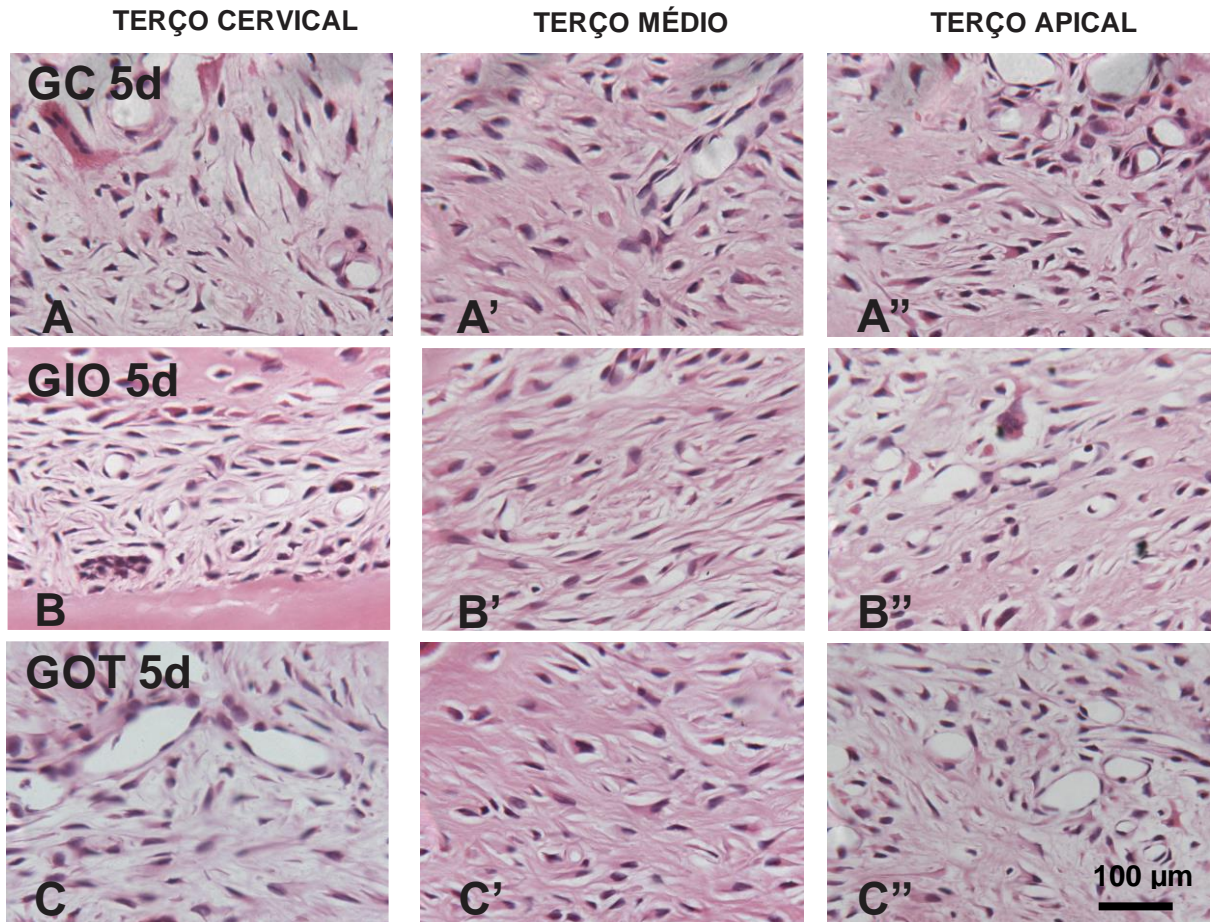


Figura 6. Fotomicrografia em microscopia de luz de corte histológico longitudinal do primeiro molar superior direito, corado pelo método da hematoxilina e eosina (HE), mostrando os terços cervical (A-C), médio (B-B'') e apical (C-C'') do periodonto da raiz mesial dos animais dos grupos controle (GC), infra-oclusão (GIO) oclusão traumática (GOT) com 5 dias de pós-operatório.

Período de 7 dias pós-operatório

Todos os grupos apresentaram uma tendência em aumento da espessura do ligamento periodontal, principalmente nos terços cervical e apical. No grupo GIO esse aumento é maior (Figura 7) (Tabela 1). A matriz extracelular fibrilar mostrou claros sinais de organização com fibras colágenas exibindo orientação definida, em particular em toda a extensão do ligamento periodontal dos animais do grupo GIO (Figura 7B-B''), além dos terços cervical e médio dos animais do grupo GC (Figura 7A-A'). É nítida a pouca orientação da matriz extracelular fibrilar nos animais do grupo oclusão traumática (Figura 7C-C'') e um ligeiro aumento na quantidade de matriz extracelular não fibrilar no grupo GIO (Tabela 3). A presença de vasos sanguíneos foi mais significativa nos terços cervical e apical dos animais do grupo oclusão traumática (Figura 7C-C'') (Tabela 4). O número de células clásticas continua com aumento evidente no grupo GOT (Tabela 6). Áreas de reabsorção externa da raiz ainda foram evidentes, principalmente nos animais do grupo oclusão traumática (Figura 7C-C'') e, em menor frequência, nos animais do grupo controle. Um fato interessante é que existe uma osteogênese intensa nas superfícies do osso alveolar, principalmente no grupoinfra-oclusão, resultando em alguns casos de anquilose.

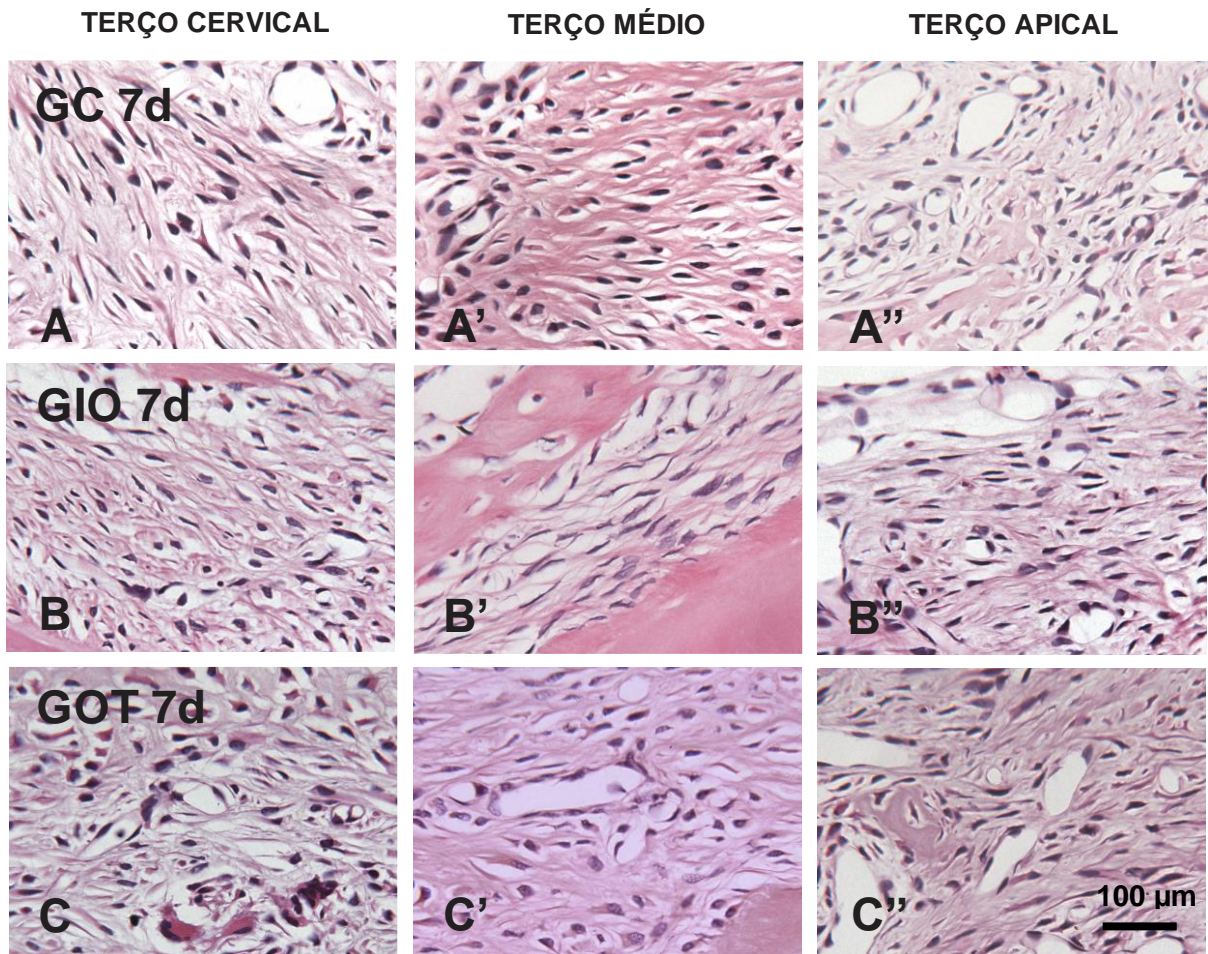


Figura 7. Fotomicrografia em microscopia de luz de corte histológico longitudinal do primeiro molar superior direito, corado pelo método da hematoxilina e eosina (HE), mostrando os terços cervical (A-C), médio (B-B'') e apical (C-C'') do periodonto da raiz mesial dos animais dos grupos controle (GC), infra-oclusão (GIO) oclusão traumática (GOT) com 7 dias de pós-operatório.

Período de 14 dias pós-operatório

Neste período experimental é visível uma nítida diminuição na espessura do ligamento periodontal do grupoinfra-oclusão nos terços médio e cervical em relação aos grupos GC e GOT, mas todos diminuem quando comparamos com o período de 7 dias. (Tabela 1) (Figura 8). As fibras colágenas mostraram maior espessura nos animais dos grupos controle e oclusão traumática (Figura 8A-A"; C-C"). Por outro lado, estas se mostraram mais discretas e, com significante orientação paralela nas superfícies do osso alveolar e radicular no terço médio radicular (Figura 8B). Áreas de anquilose foram mais visíveis no terço apical dos animais do grupoinfra-oclusão em alguns espécimes histológicos estudados, na análise quantitativa o grupo oclusão traumática apresenta maior número de células clásticas (Tabela 6). Por outro lado, persistiam áreas de reabsorção radicular e do osso alveolar, com presença de osteoclastos no terço apical no grupo GOT.

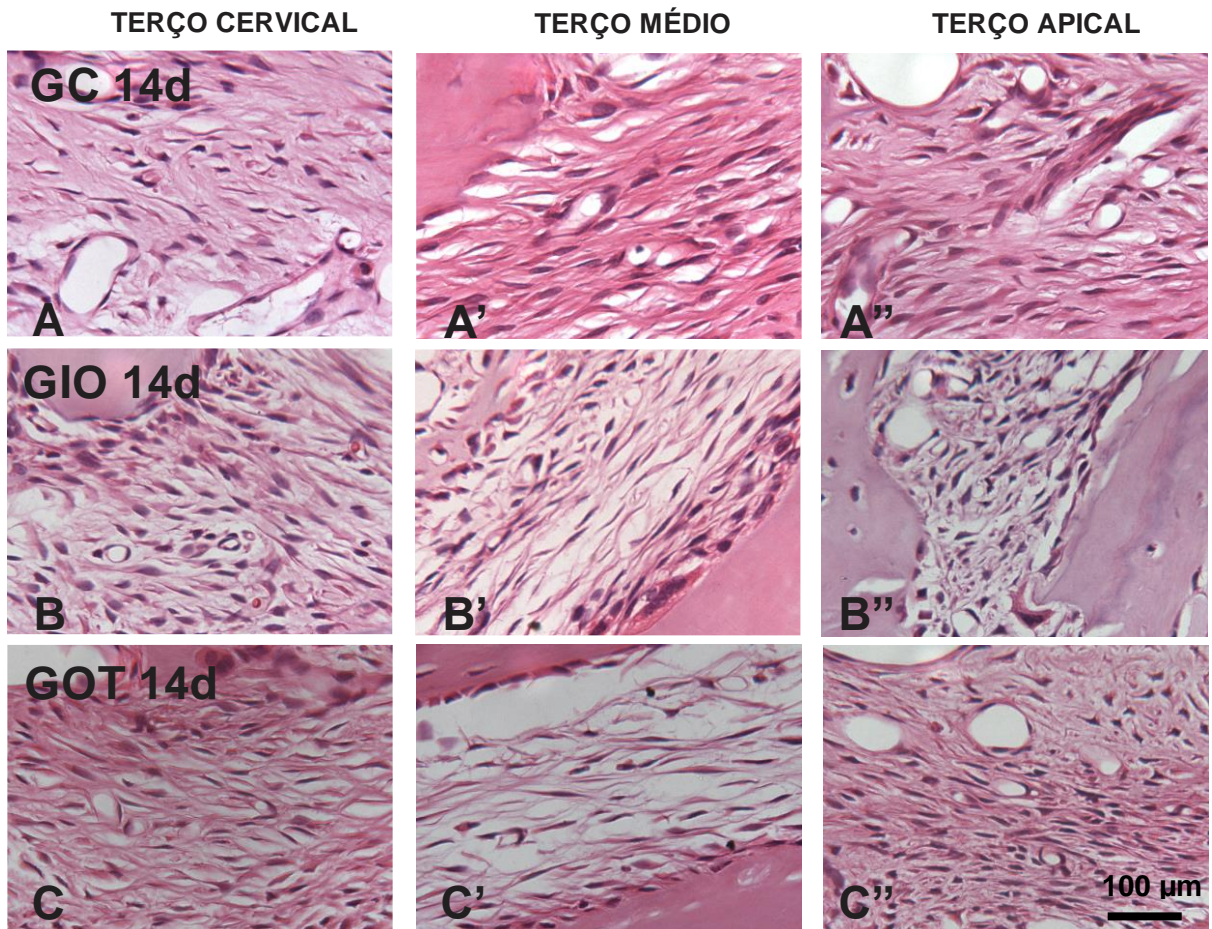


Figura 8. Fotomicrografia em microscopia de luz de corte histológico longitudinal do primeiro molar superior direito, corado pelo método da hematoxilina e eosina (HE), mostrando os terços cervical (A-C), médio (B-B'') e apical (C-C'') do periodonto da raiz mesial dos animais dos grupos controle (GC), infra-oclusão (GIO) oclusão traumática (GOT) com 14 dias de pós-operatório.

Período de 30 dias pós-operatório

Neste período experimental destaca-se a diminuição da espessura do ligamento periodontal (Figura 9) com áreas de anquilose no grupo infra-oclusão e, um aumento nos grupos GC e GOT (Tabela 1) com a presença de reabsorção inflamatória principalmente no terço apical. A matriz extracelular fibrilar, nas áreas sem anquilose, estavam bem organizadas com clara orientação tanto nos grupos controle e infra-oclusão, assim como nas áreas sem reabsorção radicular do grupo oclusão traumática (Figura 9) (Tabela 2). A matriz celular não fibrilar está pouco aumentada somente na região apical da raiz no grupo GIO (Tabela 3), com número de perfil nuclear com aumento significativo na região cervical do grupo GIO (Tabela 5), quando comparada aos outros grupos experimentais. É interessante salientar que o terço apical radicular dos animais do grupo oclusão traumática mostravam sinais de aumento da reabsorção radicular, com presença de elevada quantidade de osteoclastos (Tabela 6). Nestas áreas, as fibras colágenas não estavam com clara organização e, a rede de vasos sanguíneos mostrou-se mais nítida, com aumento brando nos grupos GIO e GOT (Tabela 4).

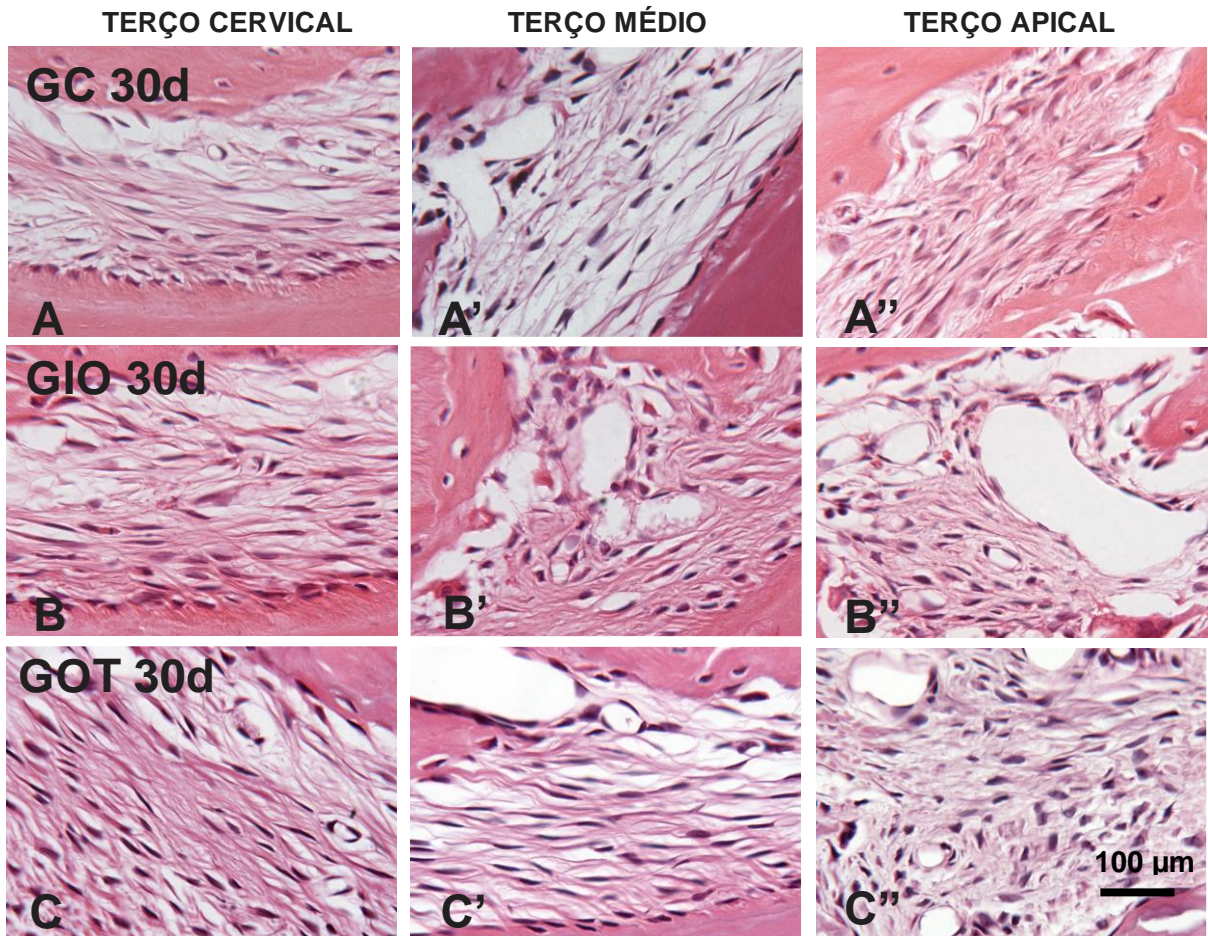


Figura 9. Fotomicrografia em microscopia de luz de corte histológico longitudinal do primeiro molar superior direito, corado pelo método da hematoxilina e eosina (HE), mostrando os terços cervical (A-C), médio (B-B'') e apical (C-C'') do periodonto da raiz mesial dos animais dos grupos controle (GC), infra-oclusão (GIO) oclusão traumática (GOT) com 30 dias de pós-operatório.

4.3. ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

4.3.1. ENZIMA FOSFATASE ÁCIDA TARTARATO-RESISTENTE (TRAP)

A análise imuno-histoquímica da enzima TRAP, revelada pelo método da imunoperoxidase indireta, mostrou imunomarcações citosólicas específicas em células da linhagem osteoclásticas (macrófagos clásticos – células mononucleadas; osteoclastos - células gigantes multinucleadas) (Figura 10). Estas células estavam presentes dispersas no ligamento periodontal (macrófagos clásticos) ou associadas às superfícies do osso alveolar ou cimento radicular (osteoclastos) (Figura 10b-d).

As análises comparativas temporais mostraram que os osteoclastos, inicialmente (grupos pós-operatórios de 3 dias) estavam associadas ao osso alveolar, não somente na face do ligamento periodontal, mas também nos espaços vasculares do osso alveolar (Figura 11a-c). Entretanto, uma considerável quantidade de macrófagos clásticos foi observada no espaço do ligamento periodontal, próximos aos vasos sanguíneos e dispersos entre as fibras colágenas, indicando uma possível migração destas células em direção as superfícies mineralizadas do periodonto (Figura 10b). Aos 5 dias de pós-operatório, os osteoclastos aumentaram significativamente na superfície radicular, principalmente no terço apical dos animais dos grupos GC e GOT (Tabela 6) e, em toda extensão da superfície radicular dos animais do grupo oclusão traumática (Figura 11d-f). Estas células clásticas reduzem em número nos animais dos grupos pós-operatório de 7 dias (Figura 11g-i) (Tabela 6). Entretanto, permanecem associadas principalmente no terço apical da raiz radicular dos animais dos grupos controle e infra-oclusão, sendo que o grupo oclusão traumática manteve ainda elevada presença destas células (Figura 11g-i). Nos animais dos grupos experimentais de 14 dias de pós-operatório, a presença de osteoclastos nas superfícies do osso alveolar e cimento radicular mostrou uma

tendência a aumentar nos grupos controle e infra-oclusão, principalmente nas áreas onde o ligamento periodontal apresentou menor espessura com alguns pontos de anquilose (Figura 12a-c); enquanto foi observada uma tendência à diminuição destas células no grupo oclusão traumática. Finalmente, nos animais dos grupos experimentais de 30 dias de pós-operatório, o número de osteoclastos aumentou significativamente no grupo oclusão traumática no terço apical, indicando uma tendência de reabsorção externa da raiz (Figura 12d-f) (Tabela 6).

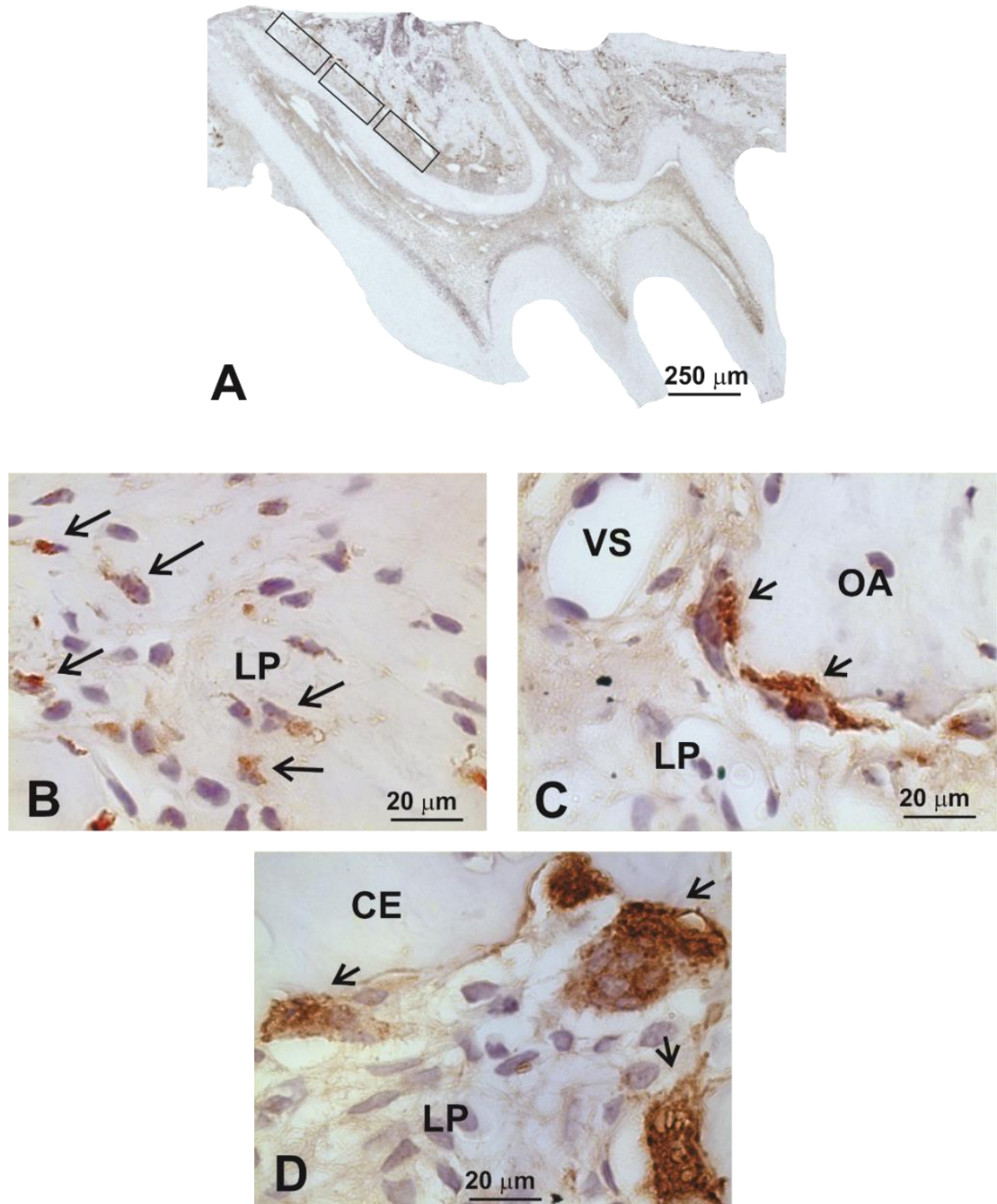


Figura 10. Fotomicrografia em microscopia de luz de corte histológico longitudinal do primeiro molar superior de animal do grupo controle (3 dias de pós-operatório), submetido à identificação da proteína TRAP através do método da imunoperoxidase indireta e contra-corado com hematoxilina. Em A observar uma vista panorâmica do primeiro molar superior exibindo a raiz mesial (fase distal) com suas subdivisões em terços. Em B-D são mostradas as células da linhagem osteoclásticas (macrófagos clásticos – células mononucleadas, setas em B; osteoclastos - células gigantes multinucleadas, setas em C-D). Notar que as imunomarcações são específicas e estrita ao citoplasma das células clásticas. Abreviaturas: LP, ligamento periodontal; OA, osso alveolar; VS, vasos sanguíneos; CE, cimento.

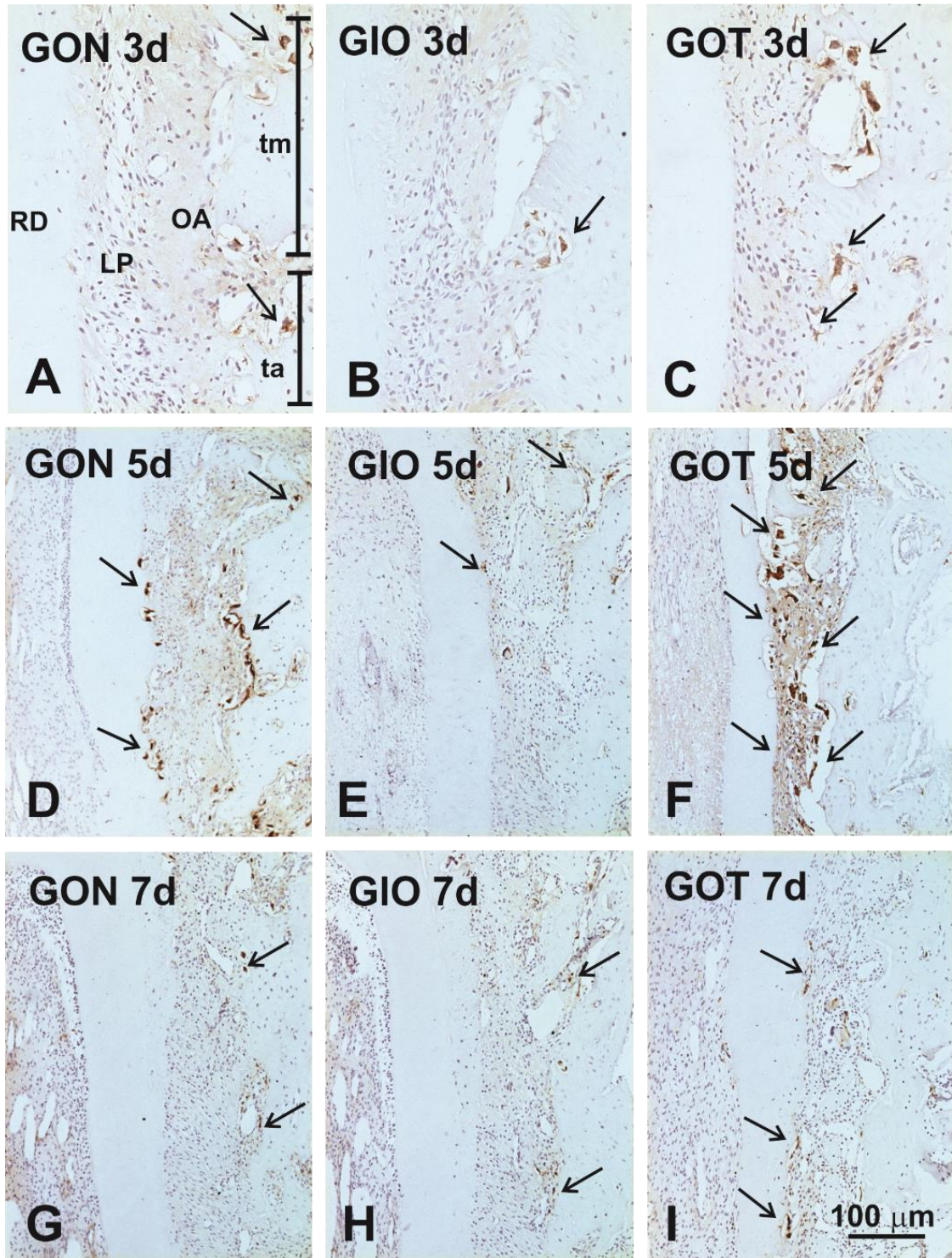


Figura 11. Fotomicrografia em microscopia de luz de corte histológico longitudinal do primeiro molar superior (raiz mesial – face distal) dos animais dos grupos controle (GC), infra-oclusão (GIO) e oclusão traumática (GOT) nos períodos experimentais de 3, 5 e 7 dias de pós-operatório, submetido à identificação da proteína TRAP em osteoclastos (setas) através do método da imunoperoxidase indireta e contra-corado com hematoxilina. Notar que a quantidade de osteoclastos mostra um claro aumento (setas) nos animais dos grupos GC e GOT com 5 dias de pós-operatório. Além disso, os animais do grupo GOT mostra uma preponderância destas células em todos os períodos pós-operatórios. Abreviaturas: LP, ligamento periodontal; OA, osso alveolar; RD, raiz dentária mesial do primeiro molar superior.

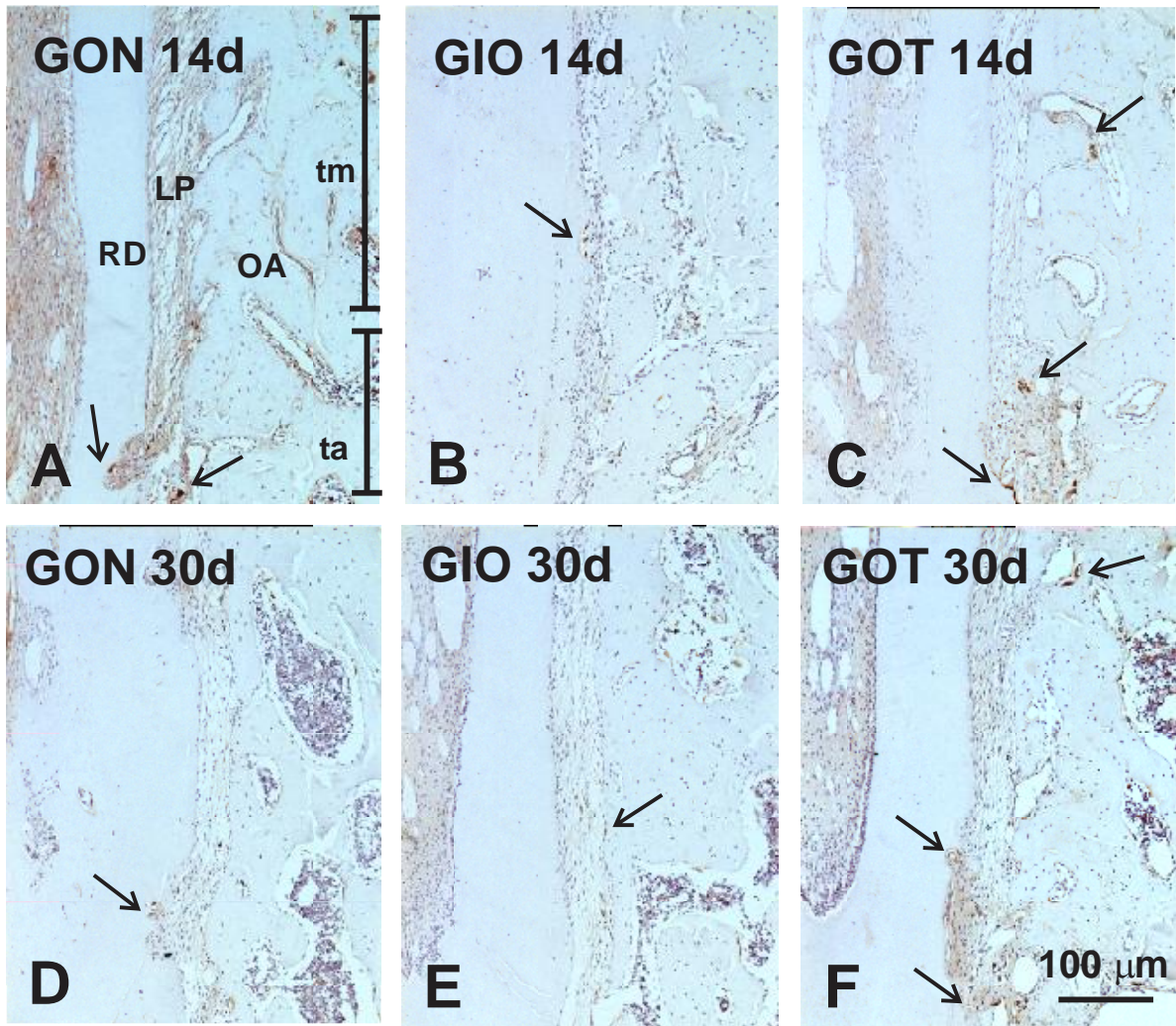


Figura 12. Fotomicrografia em microscopia de luz de corte histológico longitudinal do primeiro molar superior (raiz mesial – face distal) dos animais dos grupos controle (GC), infra-oclusão (GIO) e oclusão traumática (GOT) nos períodos experimentais de 14 e 30 dias de pós-operatório, submetido à identificação da proteína TRAP em osteoclastos (setas) através do método da imunoperoxidase indireta e contra-corado com hematoxilina. Notar que a quantidade de osteoclastos mostra uma clara diminuição nos grupos experimentais, persistindo (setas) no terço apical radicular dos grupos GC e GOT com 5 dias de pós-operatório. Abreviaturas: OA, osso alveolar; RD, raiz dentária mesial do primeiro molar superior; ta, terço apical; tm, terço médio.

4.3.2 PAN-QUERATINA

A análise imuno-histoquímica da proteína citoqueratina, através do uso do anticorpo anti-pan-queratina (citoqueratina ácida e básica), revelada pelo método da imunoperoxidase indireta, mostrou imunomarcações em células epiteliais presentes nos epitélios gengival e juncional e, dos restos epiteliais de Mallassez dispersos na junção dento-gengival e no ligamento periodontal dos demais dentes molares (Figura 13). As imunomarcações foram citosólicas e específicas, atestando a especificidade deste anticorpo (Figura 13). O propósito do uso deste anticorpo foi a identificação dos restos epiteliais de Mallassez no ligamento periodontal, a fim de averiguar se ocorriam modificações entre os grupos experimentais e entre os períodos pós-operatórios. Entretanto, a presença dos restos epiteliais de Mallassez exibindo imunorreatividade a pan-queratina foi discreta em todos os grupos experimentais desde os períodos pós-operatórios iniciais.

Com relação a esta avaliação qualitativa dos restos epiteliais de Mallassez, pode ser observado que alguns poucos estavam presentes no terço cervical da raiz nos animais dos grupos experimentais iniciais (3, 5 e 7 dias de pós-operatório) (Figura 14a-b). Estas células imunorreativas apresentavam características de degeneração celular, sendo a imunorreatividade amorfa, sem permitir a visualização dos núcleos celulares, principalmente nos animais dos grupos de 3 dias de pós-operatório (Figura 14a-b). Nos animais dos grupos experimentais de 14 e 30 dias de pós-operatório, a presença destas células epiteliais tornou-se raro, praticamente ausente nos animais com diminuição da espessura do ligamento periodontal e/ou com anquilose radicular (Figura 14c).

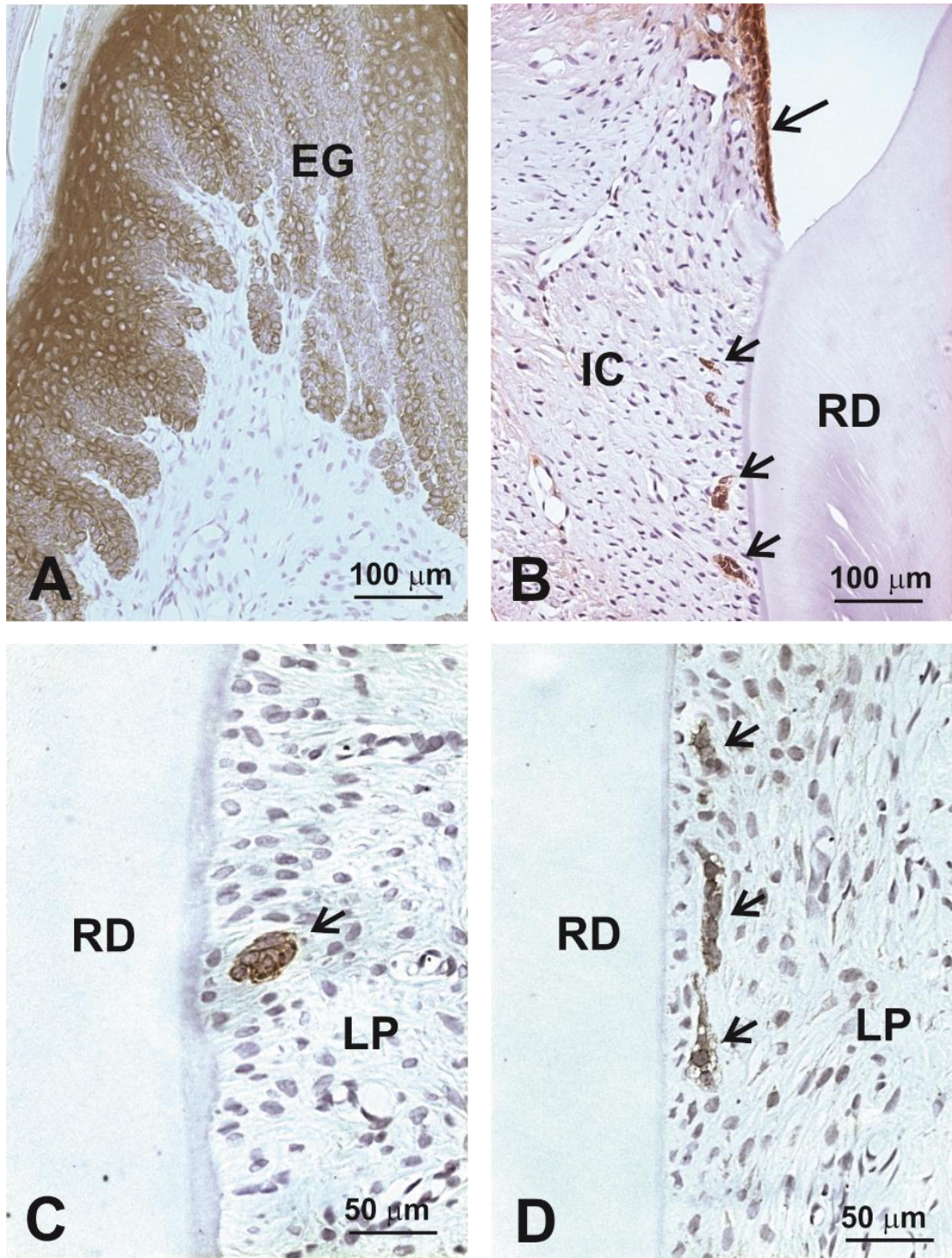


Figura 13. Fotomicrografia em microscopia de luz de corte histológico longitudinal do segundo molar superior de animal do grupo controle (GC), submetido à identificação da proteína citoqueratina (pan-queratina) (setas) através do método da imunoperoxidase indireta e contra-corado com hematoxilina. Notar que a imunorreatividade é citosólica e específica (setas). Em A é mostrada a imunomarcagem do epitélio gengival; em B é mostrado o epitélio juncional (seta maior) e os restos epiteliais de Mallassez na junção dento-gengival (setas menores); em C e D são mostrados os restos epiteliais de Mallassez no ligamento periodontal (setas). Abreviaturas: EG, epitélio gengival; IC, inserção conjuntiva da junção dentogengival; LP, ligamento periodontal; OA, osso alveolar; RD, raiz dentária.

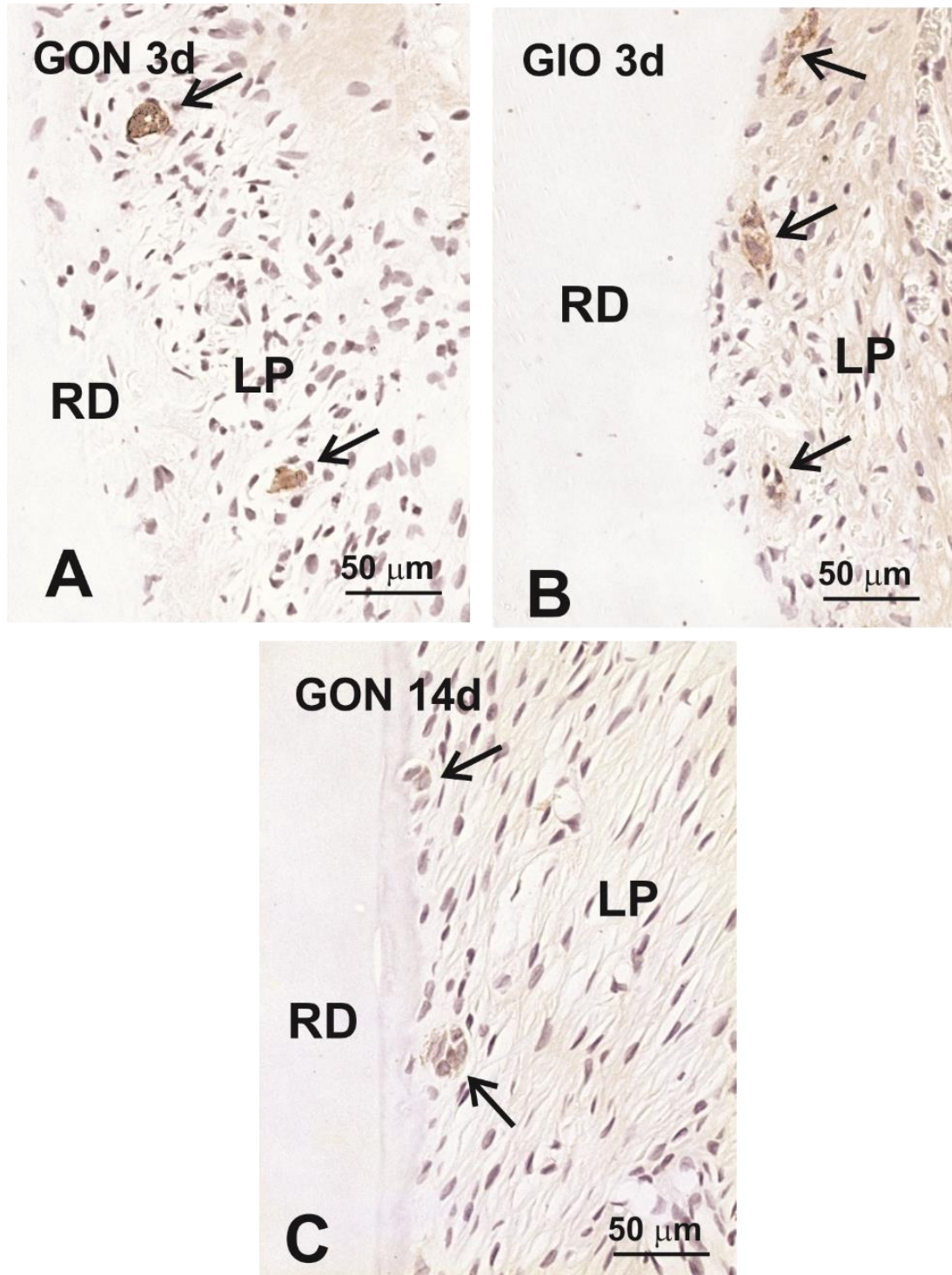


Figura 14. Fotomicrografia em microscopia de luz de corte histológico longitudinal do primeiro molar superior de animais dos grupos controle (GC, A) e infra-oclusão (GIO, B) com 3 dias de pós-operatório e, grupo GC com 14 dias de pós-operatório (C), submetido à identificação da proteína citoqueratina (pan-queratina) (setas) através do método da imunoperoxidase indireta e contra-corado com hematoxilina. Notar em A (setas), a presença de restos celulares apresentando imunorreatividade para citoqueratina; enquanto em B é possível observar alguns restos epiteliais de Mallassez exibindo discreta imunorreatividade (setas). Em C é mostrado alguns raros restos epiteliais de Mallassez, também exibindo discreta imunorreatividade granular citosólica (setas). Abreviaturas: LP, ligamento periodontal; RD, raiz dentária.

5. Discussão

O presente trabalho avaliou as características histológicas do ligamento periodontal da raiz mesial do primeiro molar superior de ratos após reimplante imediato, sob influência de oclusão traumática (grupo oclusão traumática), infra-occlusão (grupo infra-occlusão) e em condições de normalidade (grupo controle). Análises imuno-histoquímicas também foram realizadas, quanto à presença da enzima fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP) em células clásticas e da citoqueratina em restos epiteliais de Mallassez no periodonto. Para tanto, o ligamento periodontal foi avaliado nos três terços da raiz, por considerar que a absorção de forças aplicadas sobre o dente é variável. Estas forças modulam a espessura da lâmina dura, densidade do osso alveolar e ainda a viscoelasticidade do ligamento periodontal, determinada pela quantidade de vasos sanguíneos e outros elementos da matriz extracelular fibrilar e não fibrilar (35). É sugerido que o padrão de dissipação das forças mastigatórias apresenta algumas particularidades em nosso modelo experimental. Disto posto, podemos considerar que o terço médio o menos afetado por variáveis, tais como a força aplicada durante o movimento de alavanca que prejudica mais o terço apical, durante a manobra de avulsão dentária a força realizada na distal interfere mais no terço cervical por meio da lesão de tecidos locais que ficam mais expostos a invasão bacteriana.

O reparo do ligamento periodontal e o prognóstico dos tratamentos utilizados após reimplante dentário imediato, têm sido discutidos por estudos prévios, e talvez pela gravidade da lesão, o prognóstico é duvidoso. As calcificações e necrose pulpares, reabsorção radicular inflamatória e anquilose (41) são complicações comuns no processo de reparo do ligamento periodontal e pulpar que comprometem a manutenção do dente por um longo período de tempo. Essas têm como etiologias

fatores como a ausência de contenção (42,43), infecção do canal radicular (44-47), a oclusão traumática (47), tempo e local de exposição do dente no meio extra-oral (48).

O método utilizado para realização da avulsão e reimplante dentário neste estudo experimental (33) mostrou-se efetivo para a realização da avulsão dentária; contudo, algumas intercorrências foram observadas como: 1) lesão da porção cervical do periodonto de sustentação na distal do dente, pelo apoio da alavanca nessa região, durante a avulsão do elemento dentário do alvéolo. Este processo resultou na formação de um processo inflamatório crônico, evoluindo para o aparecimento e estabelecimento de uma bolsa periodontal desfavorável para o reparo da região; 2) fraturas radiculares foram averiguadas somente nos cortes histológicos, essa foram minimizadas pela elegibilidade de animais com no máximo 5 semanas de vida, onde observamos menor módulo de elasticidade óssea e rizogênese incompleta (19); 3) Falta de contenção, após o procedimento de reimplante dentário. Esse método tem como particularidade a vantagem e a possibilidade de não utilizarmos contenção, já que o dente fica preso na papila mesial do primeiro molar (33). Também podemos citar que outras técnicas que usam um “split” causam prejuízo na nutrição do rato, ocasionando aumento no número de mortes de animais dos estudos que utilizaram o split metálico nos incisivos (19).

A falta de uma contenção em nosso estudo pode ser apontada como um fator determinante para o aumento da variabilidade no padrão das respostas biológicas entre os animais do mesmo grupo. Outro fator que ela pode ter influenciado foi em relação a constante movimentação do elemento dentário que possivelmente elevou o atraso do reparo do ligamento periodontal em todos os grupos de nosso estudo. Esse atraso é menor no grupo infra-oclusão inicialmente, mas com o passar

dos períodos estudados, observamos que quando esse dente possivelmente entrou em oclusão, ocorrerá um atraso no ligamento periodontal desse grupo também.

Frente à oclusão traumática há um estreitamento mecânico inicial do ligamento periodontal. Em prosseguimento, é observado um aumento na espessura do ligamento periodontal, devido à reabsorção do osso alveolar, na tentativa de regularizar o espaço periodontal. Por outro lado, a ausência de contato oclusal pode provocar uma diminuição na espessura do ligamento periodontal por atrofia ou aumento na formação de osso, resultando em processos de anquilose em alguns casos (31). Neste estudo, a avulsão e reimplante dental influenciaram mais significativamente na espessura do ligamento periodontal que a oclusão traumática, em período inicial, provavelmente devido a movimentação dentária. No entanto, no quinto dia de pós-operatório, foi observado um estreitamento na espessura do ligamento periodontal no grupo infra-oclusão com reparo mais avançado inicialmente; enquanto nos grupos onde foi mantida a carga oclusal, a espessura do ligamento periodontal é praticamente mantida e existe uma aceleração no processo de reabsorção e aumento de células clásticas principalmente no terço apical.

Esse processo de aceleração da atividade de células clásticas é observado com maior prevalência em todos os grupos estudados e períodos no terço apical, onde a carga mastigatória é mais acentuada pela falta de contenção e o tipo de movimento mastigatório dos roedores. Outro fator para o aumento das reabsorções é proximidade de toxinas e detritos da necrose pulpar nessa região.

Esse padrão de perda dentária tardia por reabsorção inflamatória acontece em todos os grupos estudados, sendo inicialmente mais acentuado nos grupos controle e oclusão traumática. Podemos relacionar com a falta dos restos epiteliais de Malassez a partir dos períodos de 14 e 30 dias, onde esse processo está

mais intenso. Essas células foram prejudicadas também pelo trauma da avulsão dentária. Outro fator que pode estar associado é o trauma oclusal e a falta de contenção. Acreditamos que a perda delas acentua falta de homeostase do ligamento periodontal e conseqüente aumento de células clásticas. A falta dessas células diminui a deposição de cemento acelular aumentando a exposição dos túbulos dentinários e conseqüente aceleração do processo de reabsorção dentária (34-39).

Fica evidente que a ausência de contato oclusão favorece o reparo do ligamento periodontal nos períodos iniciais, seguidos de anquilose mais acentuada que os outros grupos experimentais, caracterizando por um atraso no início da reabsorção inflamatória. Contudo, a oclusão traumática promove a presença de áreas de reabsorção inflamatória desde os períodos iniciais, completando o ciclo de reabsorção dentária precocemente em relação ao grupo infra-oclusão.

6. Conclusão

Baseado neste modelo experimental de reimplante imediato de molares de ratos jovens, sem contenção, podemos concluir que:

1. A ausência de contato oclusal nos períodos iniciais aceleraram o processo de reparo do ligamento periodontal, favoreceu a permanência dos restos epiteliais de Malassez até 14 dias e diminuiu da presença de células clásticas durante o período estudado.
2. O excesso de carga oclusal resulta em desaparecimento dos restos epiteliais de Malassez por volta do terceiro dia de experimento e aumento de células clásticas influenciando desfavoravelmente o processo de reparo do periodonto.
3. O terço apical das raízes apresentou maior quantidade de processo inflamatório e conseqüente reabsorção radicular.

7. Referências Bibliográficas

1. Diangelis AJ, Andreasen JO, Ebeleseder KA, Kenny DJ, Trope M, Sigurdsson A, Andersson L, Bourguignon C, Flores MT, Hicks MI, Lenzi AR, Malmgren B, Moule AJ, Pohl Y, Tsukiboshi M; International Association of Dental Traumatology. [International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2. Avulsion of permanent teeth. Hebrew edition]. Refuat Hapeh Vehashinayim (1993). 2014 ;31(2):57-68, 90.
2. Andreasen JO, Lauridsen E, Gerds TA, Ahrensburg SS. Dental Trauma Guide: a source of evidence-based treatment guidelines for dental trauma. Dent Traumatol 2012;28(5):345-50.
3. Andersson L, Andreasen JO, Day P, Heithersay G, Trope M, Diangelis AJ, Kenny DJ, Sigurdsson A, Bourguignon C, Flores MT, Hicks ML, Lenzi AR, Malmgren B, Moule AJ, Tsukiboshi M; International Association of Dental Traumatology. International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2. Avulsion of permanent teeth. Dent Traumatol 2012 28(2):88-96.
4. Andreasen JO, Lauridsen E, Gerds TA, Ahrensburg SS. Dental Trauma Guide: a source of evidence-based treatment guidelines for dental trauma. Dent Traumatol 2012 ;28(2):142-147.
5. Andreasen JO, Andreasen FM, Bakland LK, Flores MT. Traumatic dental injuries – a manual Oxford, UK: Blackwell Munksgaard; 2003.
6. Glendor U, Marcenes W, Andreasen JO. Classification, epidemiology and etiology. In: Andreasen JO, Andreasen FM, Andersson L, editor. Textbook and color atlas of traumatic injuries to the teeth, 4th edn. Odder: Blackwell Munksgaard; 2007. p. 217–54.

7. Ritwik P, Massey C, Hagan J. Epidemiology and outcomes of dental trauma cases from an urban pediatric emergency department. *Dent Traumatol* 2015 ;31(2):97-102.
8. Vasconcelos BCE, Fernandes BC, Aguiar ERB. - Reimplante dental. *Rev. Cir. Traumat. Buco-Maxilo-Facial* 2001; 1(2):45-51.
9. Andreassen JO, Andreasen FM, Andersson L. Textbook and colors atlas of traumatic injuries to the teeth. 4th ed. Oxford: Blackwell; 2007,770 pag.
10. Petrovic B, Marković D, Peric T, Blagojevic D. Factors related to treatment and outcomes of avulsed teeth. *Dent Traumatol* 2010;26(1):52-9.
11. Poi WR, Salineiro SL, Miziara FV, Miziara EV. A educação como forma de favorecer o prognóstico do reimplante dental. *Revista da APCD* 1999; 53(6):474-479.
12. Soares IL, Soares, IJ. Técnica do reimplante dentário – Tratamento dos dentes traumatizados e conduta clínica para reimplantação. *RGO* 1998; 36(5):331-336.
13. Trope M. Clinical management of the avulsed tooth: present strategies and future directions. *Dent Traumatol* 2002; 18:1-11.
14. Gulinelli JL, Saito CT, Garcia-Júnior IR, Panzarini SR, Poi WR, Sonoda CK, Jardim EC, Faverani LP. Occurrence of tooth injuries in patients treated in hospital environment in the region of Araçatuba, Brazil during a 6-year period. *Dent Traumatol* 2008; 24(6):640-644.
15. Haralabakis NB, Sifakakis IB, Papadakis G. Etiology and management of posttraumatic malocclusions *World J Orthod.* 2007;8(4):335-43.
16. Shimono M, Ishikawa T, Ishikawa H, Matsuzaki H, Hashimoto S, Muramatsu T, Shima K, Matsuzaka K, Inoue T. Regulatory mechanisms of periodontal regeneration. *Microsc Res Tech* 2003;60(5):491-502.

17. Hamilton DW. Functional role of periostin in development and wound repair: implications for connective tissue disease J Cell Commun Signal. 2008; 2(1-2):9-17.
18. Sato K, Muramatsu T, Tsuchiya Y, Masaoka T, Enokiya Y, Hashimoto S, Shimono M. Proliferation, migration and apoptosis of periodontal ligament cells after tooth replantation Oral Dis 2010; 16:263-8.
19. Termsuknirandorn S, Hosomichi J, Soma K. Occlusal stimuli influence on the expression of IGF-1 and the IGF-1 receptor in the rat periodontal ligament. Angle Orthod 2008;78(4):610-6
20. Barros I, Muramoto T, Soma K. Effects of occlusal loading on alveolar bone remodeling and changes in the distribution of neuropeptides after tooth replantation in rats. J Med Dent Sci 2007; 54(1):49-56.
21. Rios HF, Ma D, Xie Y, Giannobile WV, Bonewald LF, Conway SJ, Feng JQ. Periostin is essential for the integrity and function of the periodontal ligament during occlusal loading in mice. J Periodontol 2008; 79(8):1480-90.
22. Glickman I. Role of occlusion in the etiology and treatment of periodontal disease. J Dent Res 1971; 50(2):199-204.
23. Motokawa M, Kaku M, Matsuda Y, Kojima S, Sumi C, Kimura A, Tanimoto K. Effects of occlusal hypofunction and its recovery on PDL structure and expression of VEGF and bFGF in rats. Clin Oral Investig 2015; 19(4):929-35.
24. Palcanis KG. Effect of occlusal trauma on interstitial pressure in the periodontal ligament. J Dent Res 1973; 52(5):903-10.
25. Biancu S, Ericsson I, Lindhe J. Periodontal ligament tissue reactions to trauma and gingival inflammation. An experimental study in the beagle dog J Clin Periodontol. 1995.

26. Glickman I. Inflammation and trauma from occlusion: co-destructive factors in chronic periodontal disease. *J Periodontol* 1963; 34:5-10.
27. Jabôr GM, Suchard CA, Martins Filho CM, Tames DR. Efeitos do Trauma Oclusal no ligamento periodontal de Molares de ratos restaurados em resina composta e amálgama. *J. Bras. oclusão ATM dor orofac* 2003; 3(10): 154-7.
28. Kaku M, Uoshima K, Yamashita Y, Miura H. Investigation of periodontal ligament reaction upon excessive occlusal load--osteopontin induction among periodontal ligament cells. *J Periodontal Res* 2005; 40(1):59-66.
29. Chen CC, Kanno Z, Soma K. Occlusal forces promote periodontal healing of transplanted teeth with enhanced nitric oxide synthesis. *J Med Dent Sci* 2005; 52(1):59-64.
30. Hu FW, Hosomichi J, Kanno Z, Soma K. The influence of occlusal stimuli on basic fibroblast growth factor expression in the periodontal healing of replanted teeth. *J Med Dent Sci* 2008; 55(1):129-35.
31. ElDeeb ME, Andreasen JO. Histometric study of the effect of occlusal alteration on periodontal tissue healing after surgical injury. *Endod Dent Traumatol* 1991; 7(4):158-63.
32. Halleen JM, Tiitinen SL, Ylipahkala H, Fagerlund KM, Väänänen HK. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption. *Clin Lab.* 2006; 52:499-509.
33. Faloni AP, Sasso-Cerri E, Katchburian E, Cerri PS. Decrease in the number and apoptosis of alveolar bone osteoclasts in estrogen-treated rats. *J Periodontal Res* 2007; 42(3):193-201.

34. Consolaro A, Consolaro MF. ERM functions, EGF and orthodontic movement or Why doesn't orthodontic movement cause alveolodental ankylosis?. *Dental Press J. Orthod* [online]. 2010; 15(2):24-32.
35. Yang Z, Li Y, Ma X, Shen L, Zhao Z, Jin F. Role of the Epithelial Cell Rests of Malassez in Periodontal Homeostasis and Regeneration - A Review. *Curr Stem Cell Res Ther* 2015;10(5):398-404.
36. Xiong J, Gronthos S, Bartold PM. Role of the epithelial cell rests of Malassez in the development, maintenance and regeneration of periodontal ligament tissues. *Periodontol 2000* 2013;63(1):217-33.
37. Talic NF, Evans CA, Daniel JC, Zaki AE. Proliferation of epithelial rests of Malassez during experimental tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2003; 123(5):527-33.
38. Heal MB, Abd-Elmotelb, NH Sarhan, NB Nagy. Putative role of epithelial rests of Malassez in alleviation of traumatic occlusion. *Tanta Dental Journal* 2015; (12) 292-301.
39. Keinan D, Cohen RE. The significance of epithelial rests of Malassez in the periodontal ligament. *J Endod* 2013; 39(5):582-7.
40. Kvinnsland S, Kristiansen AB, Kvinnsland I, Heeyraas KJ. Effect of experimental traumatic occlusion on periodontal and pulpal blood flow. *Acta Odontol Scand* 1992; 50(4):211-9.
41. Andreasen FM. Pulp healing after luxation injuries and root fracture in the permanent dentition. *Endod Dent Traumatol* 1989; 5:111–31.
42. Oikarinen KS. Splinting of traumatized teeth. In: Andreasen JO, Andreasen FM, Andersson L, eds. *Textbook and Color Atlas of Traumatic Injuries to the Teeth*. 4th edn. Copenhagen: Blackwell Publishing, 2007:842–851.

43. Kahler B, Heithersay GS. An evidence-based appraisal of splinting luxated, avulsed and root-fractured teeth. *Dent Traumatol* 2008; 24(1):2–10.
44. Trepe M. Clinical management of the avulsed tooth: present strategies and future directions. *Dent Traumatol*. 2002; 18: 1-11.
45. Andreasen JO, Andreasen FM. *Texto and atlas colorido de trauma dental*, 3rd edn. Porto Alegre: Artmed; 2001.
46. Tronstad L. Root resorption - etiology, terminology and clinical manifestations. *EndodDentTraumatol* 1988; 4:241-51.
47. Nakatsu S, Yoshinaga Y, Kuramoto A, Nagano F, Ichimura I, Oshino K, Yoshimura A, Yano Y, Hara Y. Occlusal trauma accelerates attachment loss at the onset of experimental periodontitis in rats. *J Periodontal Res* 2014; 49(3):314-22.
48. Ritwik P, Massey C, Hagan J. Epidemiology and outcomes of dental trauma cases from an urban pediatric emergency department. *Dent Traumatol* 2015; 31(2):97-102.

8. Anexo A

FIGURAS

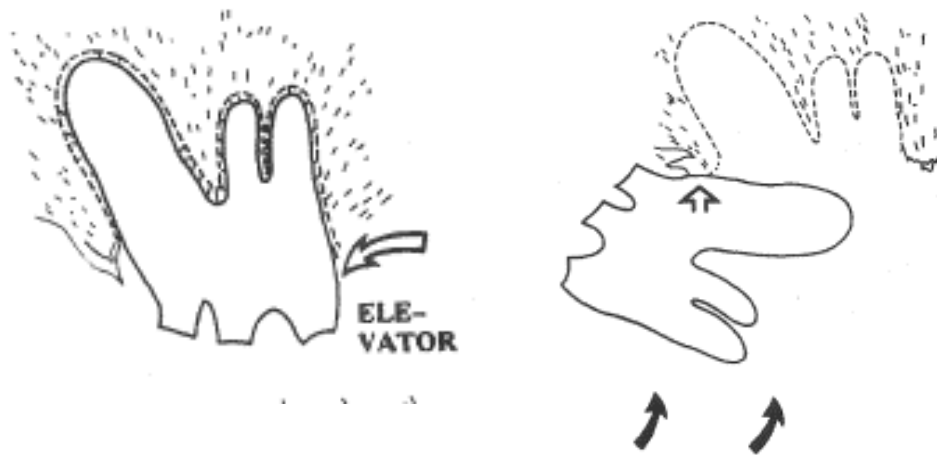


Figura 1 Apresentação esquemática da técnica de Kvinfosland (1991), para extração de molares de ratos.

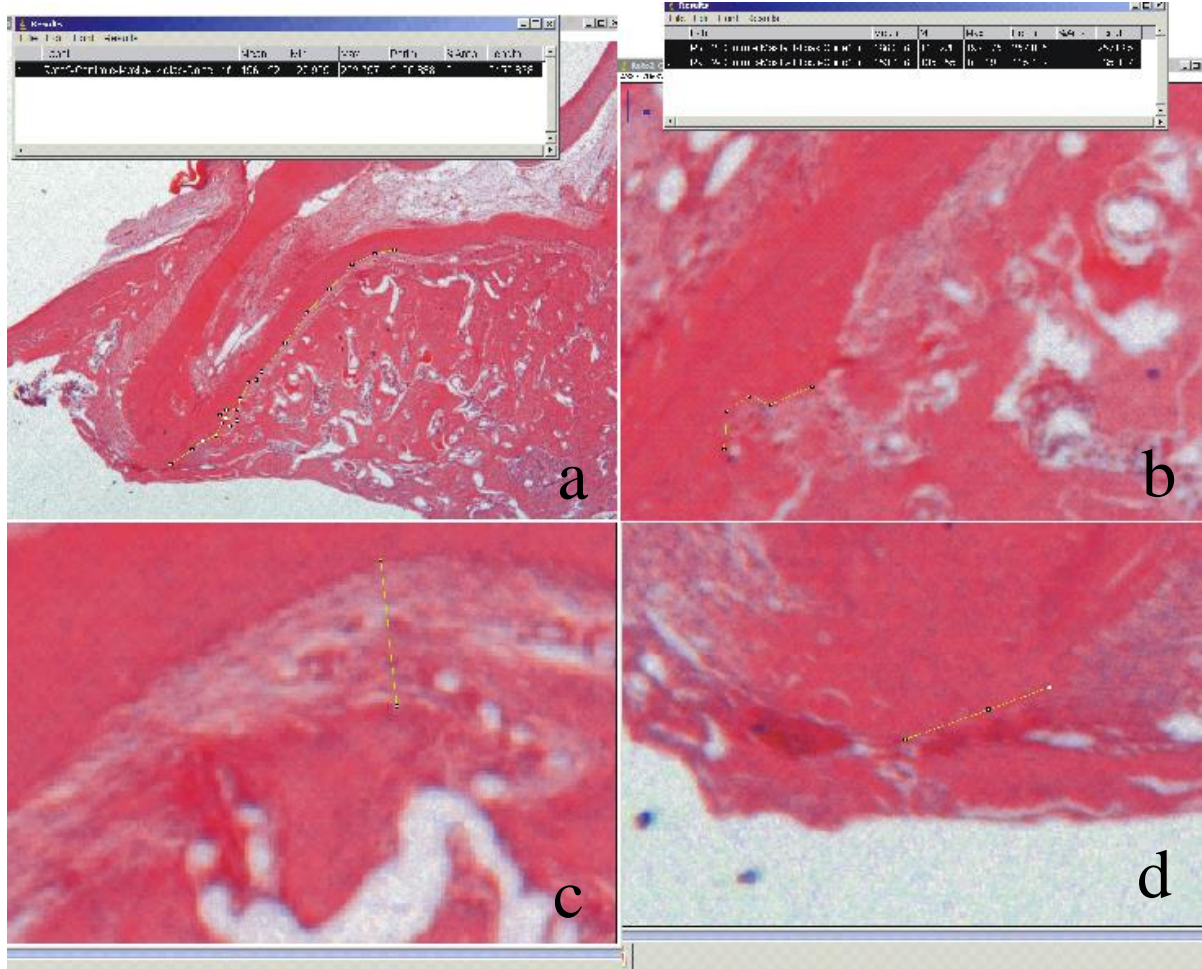


Figura 2 Quantificação no programa ImageJ do perímetro (a), área de reabsorção (b), espessura do espaço do ligamento periodontal (c), e área de anquilose (d).

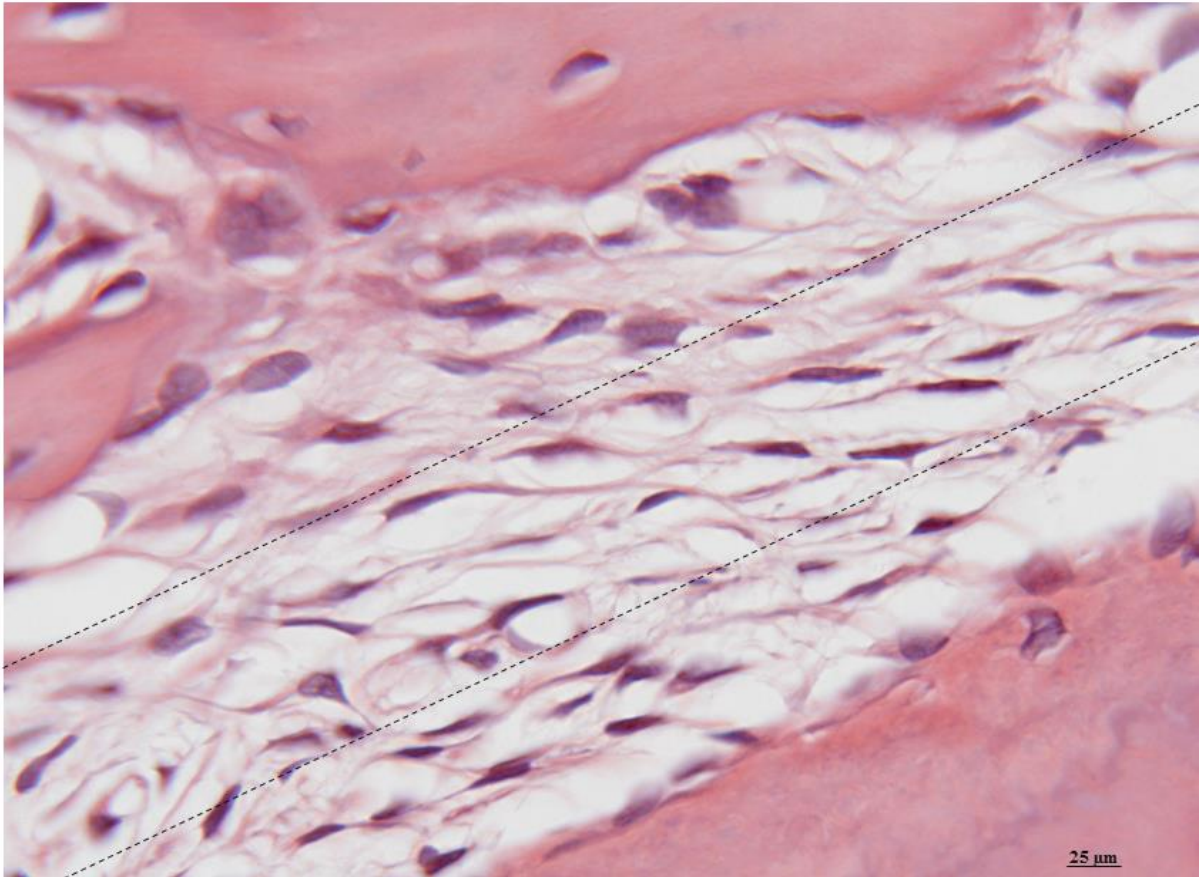


Figura 3. Apresentação do corte longitudinal do ligamento periodontal no terço cervical da raiz mesial do primeiro molar superior direito. A área avaliada está indicada pelo retângulo. Barra= 25 μ m

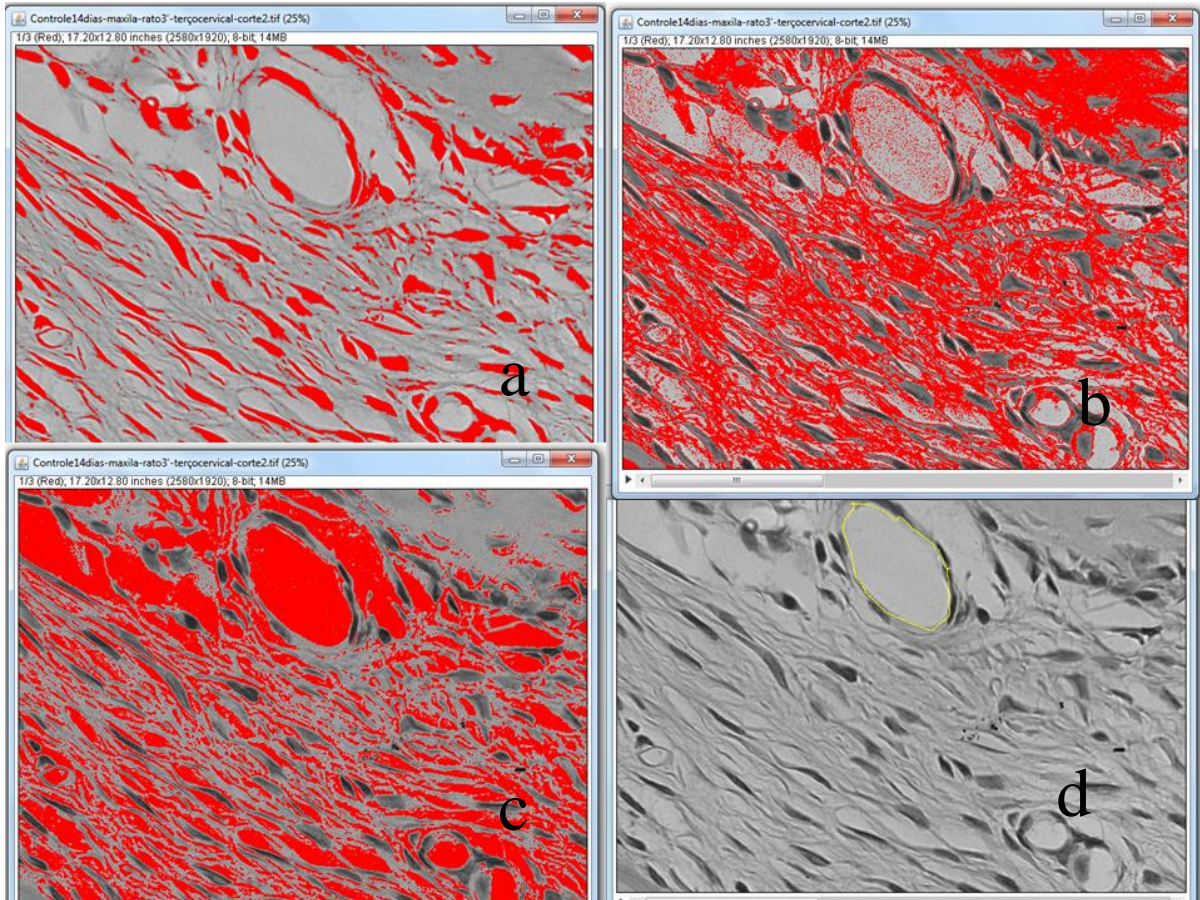


Figura 4. Quantificação no programa ImageJ da área de perfil nuclear (a), matriz extracelular (b), substância amorfa (c) e vasos sanguíneos (d).

Anexo B



Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "O efeito da carga oclusal no processo de reparo do ligamento periodontal após reimplante imediato em molar de ratos. Avaliação histológica e imunoistoquímica" sob responsabilidade da Pesquisadora DANIELA ATILI BRANDINI e colaboração de Igor Mariotto Beneti e Sara Vieira Pacanaro está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o protocolo 2010-05125.

CERTIFICATE

We certify that the research "The effect of occlusal load on the repair process of the periodontal ligament in rat molars after immediate replantation. Histological and immunohistochemical evaluation", protocol number 2010-05125, under responsibility of DANIELA ATILI BRANDINI and with collaboration of Igor Mariotto Beneti and Sara Vieira Pacanaro agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. Edilson Ervolino
CEUA Vice-Coordenador

Anexo C

Normas para publicação

DENTAL TRAUMATOLOGY

1. GENERAL

Dental Traumatology is an international journal which aims to convey scientific and clinical progress in all areas related to adult and pediatric dental traumatology. It aims to promote communication among clinicians, educators, researchers, administrators and others interested in dental traumatology. The journal publishes original scientific articles, review articles in the form of comprehensive reviews or mini reviews of a smaller area, short communication about clinical methods and techniques and case reports. The journal focuses on the following areas related to dental trauma: Epidemiology and Social Aspects Tissue, Periodontal, and Endodontic Considerations Pediatrics and Orthodontics Oral and Maxillofacial Surgery/ Transplants/ Implants Esthetics/ Restorations/ Prosthetics Prevention and Sports Dentistry. Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in

Dental Traumatology. Authors are encouraged to visit Wiley-Blackwell Author Services for further information on the preparation and submission of articles and figures.

2. ETHICAL GUIDELINES

Dental Traumatology adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

2.1. Authorship and Acknowledgements

Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript have been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal. ALL named authors must have made an active contribution to the conception and design and/or analysis and interpretation of the data and/or the drafting of the paper and ALL must have critically reviewed its content and have approved the final version submitted for publication. Participation solely in the acquisition of funding or the collection of data does not justify authorship.

Dental Traumatology adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon

submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited.

2.2. Ethical Approvals

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version, 2002 www.wma.net/e/policy/b3.htm) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. In the online submission process we also require that all authors submitting manuscripts to Dental Traumatology online must answer in the affirmative to a statement 'confirming that all research has been carried out in accordance with legal requirements of the study country such as approval of ethical committees for human and/or animal research or other legislation where applicable.' Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

2.3 Clinical Trials

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A CONSORT checklist should also be included in the submission material.

All manuscripts reporting results from a clinical trial must indicate that the trial was fully registered at a readily accessible website, e.g., www.clinicaltrials.gov.

2.4 DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations

Papers reporting protein or DNA sequences and crystallographic structure determinations will not be accepted without a Genbank or Brookhaven accession number, respectively. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

2.5 Conflict of Interest

Dental Traumatology requires that sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Acknowledgements should be brief and should not include thanks to anonymous referees and editors. The Conflict of Interest Statement should be included as a separate document uploaded under the file designation 'Title Page' to allow blinded review.

2.6 Appeal of Decision

The decision on a paper is final and cannot be appealed.

2.7 Permissions

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

2.8 Copyright Assignment

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work and its essential substance have not been published before and is not being considered for publication elsewhere. The submission of the manuscript by the authors means that the authors automatically agree to assign exclusive copyright to Blackwell Publishing if and when the manuscript is accepted for publication. The work shall not be published elsewhere in any language without the written consent of the publisher. The articles published in this journal are protected by copyright, which covers translation rights and the exclusive right to reproduce and distribute all of the articles printed in the journal. No material published in the journal may be stored on microfilm or videocassettes or in electronic database and the like or reproduced photographically without the prior written permission of the publisher.

Upon acceptance of a paper, authors are required to assign the copyright to publish their paper to Blackwell Publishing. Assignment of the copyright is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless copyright has been assigned. (Papers subject to government or Crown copyright are exempt from this requirement; however, the form still has to be signed). A completed Copyright Transfer Agreement must be sent before any manuscript can be published.

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

Poh Hoon TENG

Production Editor

Wiley Services Singapore Pte Ltd

600 North Bridge Road, #05-01 Parkview Square

Singapore 188778

Alternatively a scanned version of the form can be emailed to phteng@wiley.com or faxed to +65 6295 6202. For questions concerning copyright, please visit Blackwell Publishing's Copyright FAQ

3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/dt>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. Further assistance can be obtained from Editorial Assistant Karin Andersson at dtooffice@qualitynet.net.

3.1. Getting Started•

Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 6 or higher, Netscape 7.0, 7.1, or 7.2, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4) and go to the journal's online Submission Site: <http://mc.manuscriptcentral.com/dt>

- Log-in or click the 'Create Account' option if you are a first-time user.
- If you are creating a new account.
 - After clicking on 'Create Account', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
 - Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'
 - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your area of expertise. Click 'Finish'.
- If you have an account, but have forgotten your log in details, go to Password Help on the journals online submission system <http://mc.manuscriptcentral.com/dt> and enter your e-mail address. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.
- Log-in and select 'Author Centre.'

3.2. Submitting Your Manuscript

- After you have logged into your 'Author Centre', submit your manuscript by clicking the submission link under 'Author Resources'.
- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
- You are required to upload your files.
 - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
 - Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button.
 - When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
- To allow double blinded review, please submit (upload) your main manuscript and title page as separate files. Please upload:
 - Your manuscript without title page under the file designation 'main document' - Figure files under the file designation 'figures'.
 - The title page, Acknowledgements and Conflict of Interest Statement where applicable, should be uploaded under the file designation 'title page'
- Review your submission (in HTML and PDF format) before completing your submission by sending it to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing. All documents uploaded under the file designation 'title page' will not be viewable in the html and pdf format you are asked to review in the end of the

submission process. The files viewable in the html and pdf format are the files available to the reviewer in the review process.

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files uploaded as main manuscript documents will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The files uploaded as title page will be blinded from review and not converted into HTML and PDF. The main manuscript document file must contain the entire manuscript including abstract, text, references, tables, and figure legends, but *no* embedded figures. In the text, please reference figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below. Please note that any manuscripts uploaded as Word 2007 (.docx) will be automatically rejected. Please save any .docx file as .doc before uploading.

3.4. Blinded Review

All manuscripts submitted to *Dental Traumatology* will be reviewed by two experts in the field. *Dental Traumatology* uses double blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper and the name(s) of the author(s) will not be disclosed to the reviewers.

To allow double blinded review, please submit (upload) your main manuscript and title page as separate files. Please upload:

- Your manuscript without title page under the file designation 'main document'
 - Figure files under the file designation 'figures'
 - The title page, Acknowledgements and Conflict of Interest Statement where applicable, should be uploaded under the file designation 'title page'
- All documents uploaded under the file designation 'title page' will not be viewable in the html and pdf format you are asked to review in the end of the submission process. The files viewable in the html and pdf format are the files available to the reviewer in the review process.

3.5. Suggest a Reviewer

Dental Traumatology attempts to keep the review process as short as possible to enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process, please suggest the names and current email addresses of a potential international reviewer whom you consider capable of reviewing your manuscript. In addition to your choice the journal editor will choose one or two reviewers as well. When the review is done you will be notified under 'Manuscripts with decision' and through e-mail.

3.6. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

3.7. E-mail Confirmation of Submission

After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation e-mail after 24 hours, please check your e-mail address carefully in the system. If the e-mail address is correct please contact your IT department. The error may be caused by some sort of spam filtering on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our e-mail server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

3.8. Manuscript Status

You can access ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) any time to check your 'Author Center' for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

3.9. Submission of Revised Manuscripts

To submit a revised manuscript, locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision'. Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript. Please also remember to upload your manuscript document separate from your title page.

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original Research Articles in all areas related to adult and pediatric dental traumatology are of interest to *Dental Traumatology*. Examples of such areas are Epidemiology and Social Aspects, Tissue, Periodontal, and Endodontic Considerations, Pediatrics and Orthodontics, Oral and Maxillofacial Surgery/ Transplants / Implants, Esthetics / Restorations / Prosthetics and Prevention and Sports Dentistry.

Review Papers: *Dental Traumatology* commissions review papers of comprehensive areas and mini reviews of small areas. The journal also welcomes uninvited reviews. Reviews should be submitted via the online submission site and are subject to peer-review.

Comprehensive Reviews should be a complete coverage of a subject discussed with the Editor in Chief prior to preparation and submission. Comprehensive review articles should include a description of search strategy of relevant literature, inclusion criteria, evaluation of papers and level of evidence.

Mini Reviews are covering a smaller area and may be written in a more free format.

Case Reports: *Dental Traumatology* accepts Case Reports but these will only be published online and will not be included in the printed version unless specifically requested by the Editor-in-Chief.

Case Reports illustrating unusual and clinically relevant observations are acceptable, but their merit needs to provide high priority for publication in the journal. They should be kept within 3-4 printed pages and need not follow the usual division into material and methods etc, but should have an abstract. The introduction should be kept short. Thereafter the case is described followed by a discussion.

Short Communications of 1-2 pages are accepted for quick publication. These papers need not follow the usual division into Material and Methods, etc., but should have an abstract. They should contain important new information to warrant publication and may reflect improvements in clinical practice such as introduction of new

technology or practical approaches. They should conform to a high scientific and a high clinical practice standard.

Letters to the Editor, if of broad interest, are encouraged. They may deal with material in papers published in Dental Traumatology or they may raise new issues, but should have important implications.

Meetings: advance information about and reports from international meetings are welcome, but should not be submitted via the online submission site, but send directly to the journal administrator Karin Andersson at dtooffice@qualitynet.net

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. It is preferred that manuscript is professionally edited. A list of independent suppliers of editing services can be found at: http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Abbreviations, Symbols and Nomenclature: Abbreviations should be kept to a minimum, particularly those that are not standard. Non-standard abbreviations must be used three or more times and written out completely in the text when first used. Consult the following sources for additional abbreviations: 1) CBE Style Manual Committee. Scientific style and format: the CBE manual for authors, editors, and publishers. 6th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1994; and 2) O'Connor

M, Woodford FP. Writing scientific papers in English: an ELSE-Ciba Foundation guide for authors. Amsterdam: Elsevier-Excerpta Medica; 1975.

Font: When preparing your file, please use only standard fonts such as Times, Times New Roman or Arial for text, and Symbol font for Greek letters, to avoid inadvertent character substitutions. In particular, please do not use Japanese or other Asian fonts. Do not use automated or manual hyphenation. Use double spacing when writing.

5.2. Structure

All papers submitted to *Dental Traumatology* should include: Title Page, Abstract, Main text, References and Tables, Figures, Figure Legends, Conflict of Interest Statement and Acknowledgements where appropriate. Title page, Conflict of Interest Statement and any Acknowledgements must be submitted as separate files and uploaded under the file designation Title Page to allow blinded review. Manuscripts must conform to the journal style. Manuscripts not complying with the journal style will be returned to the author(s).

Title Page: should be uploaded as a separate document in the submission process under the file designation 'Title Page' to allow blinded review. It should include: Full title of the manuscript, author(s)' full names and institutional affiliations including city, country, and the name and address of the corresponding author. If the author does not want the e-mail address to be published this must be clearly indicated. The title page should also include a running title of no more than 60 characters and 3-6 keywords.

Abstract is limited to 300 words in length and should contain no abbreviations. The abstract should be included in the manuscript document uploaded for review as well

as inserted separately where specified in the submission process. The abstract should convey the essential purpose and message of the paper in an abbreviated form. For original articles the abstract should be structured with the following headings: Background/Aim, Material and Methods, Results and Conclusions. For other article types, please choose headings appropriate for the article.

Main Text of Original Articles should be divided into Introduction, Material and Methods, Results and Discussion. During the editorial process reviewers and editors frequently need to refer to specific portions of the manuscript, which is difficult unless the pages are numbered. Authors should number all of the pages consecutively.

Introduction should be focused, outlining the historical or logical origins of the study and not summarize the results; exhaustive literature reviews are inappropriate. Give only strict and pertinent references and do not include data or conclusions from the work being reported. The introduction should close with the explicit statement of the specific aims of the investigation or hypothesis tested.

Materials and Methods must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced. As a condition of publication, authors are required to make materials and methods used freely available to academic researchers for their own use. Describe your selection of observational or experimental participants clearly. Identify the method, apparatus and procedures in sufficient detail. Give references to established methods, including statistical methods, describe new or modify methods. Identify precisely all drugs used including generic names and route of administration.

(i) Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A CONSORT checklist should also be included in the submission material. All manuscripts reporting results from a clinical trial must indicate that the trial was fully registered at a readily accessible website, e.g., www.clinicaltrials.gov.

(ii) Experimental subjects: experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version, 2002 www.wma.net/e/policy/b3.htm) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

(iii) Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.

Results should present the observations with minimal reference to earlier literature or to possible interpretations. Present your results in logical sequence in the text, tables and illustrations giving the main or most important findings first. Do not duplicate data in graphs and tables.

Discussion may usually start with a brief summary of the major findings, but repetition of parts of the Introduction or of the Results sections should be avoided. The section

should end with a brief conclusion and a comment on the potential clinical relevance of the findings. Link the conclusions to the aim of the study. Statements and interpretation of the data should be appropriately supported by original references.

Main Text of Review Articles comprises an introduction and a running text structured in a suitable way according to the subject treated. A final section with conclusions may be added.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledgements should be brief and should not include thanks to anonymous referees and editors.

Conflict of Interest Statement: All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. The Conflict of Interest Statement should be included as a separate document uploaded under the file designation 'Title Page' to allow blinded review.

5.3. References

As the Journal follows the Vancouver system for biomedical manuscripts, the author is referred to the publication of the International Committee of Medical Journal Editors: Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Int Med* 1997;126:36-47.

Number references consecutively in the order in which they are first mentioned in the

text. Identify references in texts, tables, and legends by Arabic numerals (in parentheses). Use the style of the examples below, which are based on the format used by the US National Library of Medicine in Index Medicus. For abbreviations of journals, consult the 'List of the Journals Indexed' printed annually in the January issue of Index Medicus.

We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting. EndNote reference styles can be searched for here: www.endnote.com/support/enstyles.asp. Reference Manager reference styles can be searched for here: www.refman.com/support/rmstyles.asp

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

Journals:

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

Examples:

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

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

Books and other monographs:

Examples:

Personal author(s) Grossman LI. Endodontic practice. 10th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1981. p. 176-9. Chapter in book: Sanders B, Brady FA, Johnson R. Injuries. In: Sanders B, editor. Pediatric oral and maxillofacial surgery. St. Louis: Mosby; 1979. p. 330-400.

5.4. Tables, Figures and Figure Legends

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

Figures: All graphs, drawings and photographs are considered figures and should be numbered in sequence with Arabic numerals and abbreviated Fig(s). Each figure should have a legend and all legends should be numbered correspondingly and included at the end of the manuscript. Text on the figures should be in capitals. Figures should be planned to fit the proportions of the printed page. All figures and artwork must be provided in electronic format. Please save vector graphics (e.g. line artwork) in Encapsulated Postscript Format (EPS) and bitmap files (e.g. half-tones) or clinical or in vitro pictures in Tagged Image Format (TIFF). JPEG files are also acceptable. Detailed information on our digital illustration standards can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

Unnecessary figures and parts (panels) of figures should be avoided: data presented in small tables or histograms, for instance, can generally be stated briefly in the text

instead. Figures should not contain more than one panel unless the parts are logically connected

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

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

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

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

Check your electronic artwork before submitting it:

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

Permissions: If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

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

5.5. Supporting Material

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

Supporting Material, such as data sets or additional figures or tables, that will not be published in the print edition of the journal, but which will be viewable via the online edition, can be submitted. It should be clearly stated at the time of submission that the Supporting Material is intended to be made available through the online edition. If the size or format of the Supporting Material is such that it cannot be accommodated on the journal's Web site, the author agrees to make the Supporting Material available free of charge on a permanent Web site, to which links will be set up from the journal's

website. The author must advise Blackwell Publishing if the URL of the website where the Supporting Material is located changes. The content of the Supporting Material must not be altered after the paper has been accepted for publication.

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

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

6. AFTER ACCEPTANCE

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

6.1 Proof Corrections

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

6.2 Early View (Publication Prior to Print)

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

6.3 Author Services

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

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

6.4 Author Material Archive Policy

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

6.5 Offprints and Extra Copies

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

6.6 Note to NIH Grantees

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