

Marina Fuzette Amaral

**Influência da oclusão traumática no processo de reparo do periodonto em
dentes submetidos à subluxação**

2016

Marina Fuzette Amaral

**Influência da oclusão traumática no processo de reparo do periodonto em
dentes submetidos à subluxação**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do Grau de mestre em Odontologia – Área de Clínica Integrada.

Orientador: Prof. Tit. Wilson Roberto Poi

Coorientadora: Prof. Ass. Dra. Daniela Atili Brandini

Araçatuba – São Paulo

2016

Catálogo-na-Publicação

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

- A 485i Amaral, Marina Fuzette.
Influência da oclusão traumática no processo de reparo
do periodonto em dentes submetidos à subluxação / Marina
Fuzette Amaral. – Araçatuba, 2016
94 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Dr. Wilson Roberto Poi
Coorientadora: Profa. Dra. Daniela Atili Brandini
1. Traumatismos dentários 2. Oclusão dentária traumática
3. Periodonto I. T.

Black D2
CDD 617.6

Dedicatoria

Dedicatória

A Deus, por estar comigo em todos os momentos e me iluminando, sendo meu refúgio e fortaleza nos momentos mais difíceis. Sendo essencial em minha vida, autor do meu destino, meu guia e socorro presente na hora da angústia. A ele, minha eterna gratidão.

Agradeço também a Ele a oportunidade de vivenciar essa experiência que resultou em imensos aprendizados, Por toda força, calma, sabedoria e por me abençoar com o convívio de pessoas iluminadas durante a realização desse trabalho.

Aos meus pais, Marcos e Cristina,

Minhas inspirações para me tornar uma pessoa e profissional cada vez melhor em tudo. Vocês são os maiores exemplos da minha vida e que com muito amor e compreensão sempre estiveram ao meu lado, me escutando, aconselhando e apoiando minhas decisões. Obrigada, por acreditarem e investirem em mim, e por isso proporcionaram momentos de tranquilidade e segurança para a conclusão desse trabalho. Obrigada por serem minha base, minha referência, e por todos os valores de vida que me ensinaram e continuam a ensinar. Obrigada por possibilitarem que eu vivesse esse momento e assim dar mais um passo para alcançar meus sonhos. Tenho muito orgulho e agradeço a Deus todos os dias por ter vocês como pais. Amo vocês!

Aos meus irmãos, Daniel e Mathias

Pelo amor, apoio e motivação incondicional. Que sempre me impulsionam em direção às vitórias dos meus desafios.

Muito obrigada por sempre estarem ao meu lado, me apoiando e ajudando nas minhas decisões. Vocês foram essenciais durante esses anos, e com certeza tornaram a minha vida mais alegre.

Ao meu noivo Anderson

Que imensamente me incentivou e me apoiou durante todo esse trabalho. Você não só me ajudou na parte técnica dessa pesquisa como transportar e manipular os ratos, mas também me ajudou com seu carinho, companheirismo, atenção, amor e paciência. Você é uma pessoa brilhante e de imensa bondade! Compartilhar com você minha vida e em especial esse momento me faz ainda mais feliz. Obrigada por tudo! Obrigada por me fazer feliz! Você é o amor da minha vida!

Te amo!

À minha família (avós, tios e tias, primos e primas)

Que direta ou indiretamente me ajudaram e incentivaram para conclusão dessa etapa da minha vida.

Agradecimentos Especiais

Agradecimentos Especiais

Durante esse dois anos só tenho a agradecer a todos que passaram pelo meu caminho e que com certeza deixaram um pouco de si. Os momentos de alegria serviram para me permitir acreditar na beleza da vida, e os de sofrimento, serviram para um crescimento pessoal único. É muito difícil transformar sentimentos em palavras, mas serei eternamente grata a vocês, pessoas imprescindíveis para a realização e conclusão deste trabalho.

À minha co-orientadora,

Prof.^a Dra. Daniela Atili Brandini , por acreditar que eu era capaz e pela orientação. Mesmo chegando sem me conhecer direito, você abriu as portas, como uma mãe que abre os braços para receber um filho. Nesse mundo, repleto de pessoas ruins, você me faz acreditar que os bons são a maioria. Só tenho a agradecer aos seus ensinamentos (pessoais e acadêmicos), orientações, palavras de incentivo, puxões de orelha, paciência e dedicação. Você é uma pessoa ímpar, na qual busco inspirações para ser uma profissional que trabalha e

*ensina com ética e qualidade. Tenho orgulho em dizer
que um dia fui sua orientada.*

Ao meu orientador,

*Prof. Dr. Wilson Roberto Poi que muito me ensinou,
contribuindo para o meu desenvolvimento científico e
intelectual. Pesquisador brilhante e pessoa genial.
Obrigada por permitir conviver com você durante o
desenvolvimento desse trabalho e pelo meu
amadurecimento e aprendizado na pesquisa!*

*Aos professores da Disciplina de Clínica Integrada, Celso
Sonoda, Denise Pedriní, José Carlos Monteiro de Castro e
Eloá Luvizuto pelos conhecimentos e experiências
transmitidas, acolhimento, confiança e
companheirismo. Sou feliz por conviver com uma equipe
tão brilhante e solidária e pela oportunidade de
aprender com vocês tantos ensinamentos clínicos.
Carrego comigo a importância do trabalho em equipe e
a formação teórica, clínica e humanista que
proporcionaram e me fizeram crescer como pessoa e
profissional. Obrigada!*

*Ao departamento de Ciências Básicas, principalmente em
nome do Prof. Cláudio Casatti e Edilson Ervolino, pelo*

suporte e ajuda para a realização desse projeto. Aos alunos desse departamento, Kelly e Gestter que se disponibilizaram a me ajudar. Muito obrigada!

Aos alunos de pós-graduação do Departamento de Clínica Integrada: Melyna Marques de Almeida, Lorraine Lopes De Faria e Caio Vinicius Debortoli. E alunos de graduação Sara Felipe Akabane e Cintia Vanessa Laves do Nascimento, que são pessoas brilhantes e dedicadas, e que me ajudaram muito em várias etapas dessa minha fase.

Obrigada Caio Vinicius Debortoli, Sara Felipe Akabane e Cintia Vanessa Laves do Nascimento pela amizade e ajuda no desenvolvimento deste projeto e também pela oportunidade de trabalharmos juntos para que essa pesquisa fosse concretizada !. Você s são alunos de extrema responsabilidade e competência.!

Obrigada Melyna Marques de Almeida e Lorraine Lopes de Faria, vocês foram Amigas e companheiras sempre dispostas a ajudar e foram fundamentais nesses dois anos de trabalho, desde os pequenos até os grandes problemas. Obrigada pelo apoio, carinho e paciência que vocês sempre tiveram comigo. Vocês são iluminadas e

sou grata por ter convivido e aprendido com vocês.

Obrigada por tornarem meus dias melhores!

Ao Sr. Odair Vicente que tornou todas as clínicas mais acolhedoras e sempre me incentivou a ir à busca dos meus sonhos. Obrigada pela ajuda durante as perfusões e anestesia dos ratinhos. Obrigada por todas as palavras de incentivo e pelos chás feitos com tanto carinho. Obrigada pela ajuda na realização desse trabalho e na minha formação pessoal Sr. Dadá!

A minha família (Mãe, pai, irmãos, cunhada e noivo), pelos incentivos na parte experimental seja durante o dia ou noite, com chuva, neblina ou sol. Por acreditar que tudo daria certo no final, mesmo quando a esperança era quase nula. Obrigada pelos ouvidos que escutaram tantas reclamações e pelas risadas e carinho que amenizavam o stress diário.

Aos alunos da Pós-Graduação do Programa de Odontologia com os quais tive o prazer de realizar algumas disciplinas. Foram momentos de aprendizado e apoio mútuo. Obrigada por terem contribuído, cada um a sua maneira, para minha formação. Vocês fizeram os meus dias muitos mais divertidos!

Agradecimientos

Agradecimentos

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substituí a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”

Charles Chaplín

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba-UNESP, por proporcionar a realização desta pesquisa.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia UNESP - Araçatuba, Prof. Dr. André Luiz Fraga Briso pelo acolhimento para o desenvolvimento deste trabalho.

As funcionárias da secretaria de Pós-graduação, Valéria, Cristiane e Lillian pela atenção, presteza e simpatia concedida.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-Unesp.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Renato, Paulo Roberto Gratão e Marco pela atenção e disponibilidade durante a realização desse trabalho.

Aos colegas do curso de pós-graduação e alunos de graduação pela amizade e companheirismo, e que de maneira direta ou indireta, contribuíram para meu crescimento e à realização deste trabalho.

Epígrafe

*“A mente que se abre a uma nova idéia
jamaís voltará ao seu tamanho
original.”
Albert Einstein*

Resumo

RESUMO

Amaral MF. Influência da oclusão traumática no processo de reparo do periodonto em dentes submetidos á subluxação. (Dissertação). Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2016.

A subluxação caracteriza-se pelo dano ao ligamento periodontal (LP) com sangramento e mobilidade anormal do dente; e a presença de edema na região apical do dente pode provocar discreta extrusão. O objetivo desse estudo foi avaliar a influência da oclusão traumática (OT) no processo de reparo do periodonto em dentes submetidos à subluxação, por meio de análises histomorfométricas e imunoistoquímica. Para este estudo, 90 ratos Wistar com 12 semanas de idade; foram distribuídos em três grupos: controle (C), subluxação (S) e subluxação com oclusão traumática (S+OT); nos períodos experimentais de 7 e 21 dias. A subluxação foi induzida pela aplicação de uma força de 900cN no sentido ocluso-gengival na superfície oclusal do 1ºMSD calibrada por um tensiômetro e a OT foi induzida por uma restauração de resina composta na superfície oclusal do primeiro molar superior direito (1ºMSD). Para comparação estatística entre os grupos e períodos foi usado o teste de Kruskal-Wallis com Dunn post hoc teste. No período de 7 dias, houve um aumento significativo da espessura do LP (S-34% e S+OT-80%), da substância fundamental amorfa (S-84% e S+OT-148%) e uma redução significativa da área óssea (S-60,8% e S+OT-81,8%) em relação ao grupo controle. Aos 21 dias houve um aumento da espessura do ligamento periodontal significativo no grupo S+OT e na porcentagem de fibras colágenas (S-86%) no grupo S, mas não no grupo S+OT. A porcentagem de substância fundamental amorfa permaneceu proporcionalmente aumentada nos dois grupos experimentais e o perfil nuclear mostrou um aumento significativo no grupo S quando comparada ao período de

7 dias. Nos 2 grupos experimentais também houve um aumento do número de células TRAP positivas tanto no LP (4x) quanto no osso do septo alveolar (16x). O grupo S apresentou um pequeno aumento na porcentagem da área óssea do septo alveolar, enquanto no grupo S+OT houve redução de 52% da área óssea quando comparada ao mesmo grupo no período de 7 dias. A subluxação com ou sem a OT provocou apenas reabsorções radiculares superficiais e a OT foi capaz de prejudicar o reparo das áreas radiculares reabsorvidas após a subluxação no período de 21 dias. Assim conclui-se que a oclusão traumática agravou os danos no ligamento periodontal, no osso alveolar e na superfície radicular gerados após a subluxação, bem como atrasou o processo de reparo dos mesmos.

Palavras-chave: Traumatismos dentários. Oclusão dentária traumática. Periodonto.

Abstract

ABSTRACT

Amaral MF. The influence of traumatic occlusion on the repair process in teeth subjected to subluxation. (Dissertation). Araçatuba: Dentistry School of Estadual Paulista University; 2016.

Subluxation is characterised by damage to the periodontal ligament (PDL), accompanied by bleeding and abnormal tooth mobility. The presence of edema in the apical region of the tooth can provoke discrete extrusion. The aim of this study was to assess the influence of traumatic occlusion (TO) on the periodontal repair process in teeth submitted to subluxation, by means of histomorphometrical and immunohistochemical analyses. For this study, 90 Wistar rats aged 12 weeks were divided into three groups: control (C), subluxation (S) and subluxation with traumatic occlusion (S+TO); with experimental periods of 7 and 21 days. Subluxation was induced by applying a 900cN force in the occlusal-gingival sense on the occlusal surface of the 1st SRM calibrated by a tensiometer. TO was induced by a composed resin restoration on the occlusal surface of the first superior right molar (1st SRM). The Kruskal-Wallis with Dunn post-hoc test was used for group and period comparison. At 7 days, there was a significant increase in PDL width (S-34% and S+TO-80%), amorphous fundamental substance (S-84% and S+TO-148%), and a significant reduction of bone surface (S-60.8% and S+TO-81.8%), in comparison to the control group. After 21 days, there was a significant increase in the periodontal ligament width in group S+TO and in the percentage of collagen fibres in group S (86%), but not in group S+TO. The percentage of amorphous fundamental substance remained proportionally increased in the two experimental groups, and the nuclear profile showed a significant increase in group S, compared to the 7 days period. In the two

experimental groups an increase in positive TRAP cells was also observed, in the PDL (4x) as well as in the bone area of the alveolar septum (16x). Group S presented a small increase in the alveolar septum's bone area, whereas group S+TO showed a 52% bone area reduction compared to the same group at 7 days. The subluxation with or without TO caused only superficial root resorption. The TO was able to damage the repair process of reabsorbed root areas after 21 days of subluxation. It can be concluded that traumatic occlusion aggravates post-subluxation damage to the periodontal ligament, the alveolar bone and the radicular surface, and has a delaying effect on the repair process.

Keywords: Tooth Injuries. Dental Occlusion, Traumatic. Periodontium.

.

Lista de Figuras

- Figura 1 Corte histológico transversal do primeiro molar superior direito corado com hematoxilina e eosina. HE. Objetiva de 2,5x. 1 a 5 = raízes analisadas. P = polpa, D = dentina, C = cemento, LP = ligamento periodontal e OA = osso alveolar. Retângulos brancos = locais do ligamento periodontal onde foram analisadas as porcentagens de fibras colágenas, vasos sanguíneos e substância fundamental amorfa. Retângulo preto = local usado para análise da área óssea. Linhas amarelas = onde foram realizadas as medidas da largura do ligamento periodontal. 41
- Figura 2 Ligamento periodontal entre as raízes do 1º MSD submetido à coloração com HE (Objetiva de 100x). A - fotografia original; B – análise da área dos vasos sanguíneos (vasos sanguíneos delimitados em vermelho para mensuração)..... 43
- Figura 3 Ligamento periodontal do 1º MSD submetido à coloração com tricrômico de masson (Objetiva de 40x). A – fotografia original; B – fotografia formatada, remoção das áreas correspondentes á dentina e osso; C – fotografia editada pelo programa IMAGE J para análise da área de fibras colágenas..... 44

Figura 4	Ligamento periodontal do 1º MSD. A – fotografia original, coloração com HE, durante a contagem dos perfis nucleares no programa IMAGE J usando a ferramenta de marcação “Mult point” (Objetiva de 100x); B – fotografia original, coloração com HE, imunohistoquímica para detecção de TRAP durante a contagem de células TRAP positivas no programa IMAGE J usando a ferramenta de marcação “Mult point” (Objetiva de 20x).....	45
Figura 5	Osso alveolar entre as raízes do 1º MSD submetido à coloração com HE (Objetiva de 20x). A – fotografia original; B – fotografia formatada, remoção das áreas de vasos sanguíneos para análise da área óssea; C – fotografia editada pelo programa IMAGE J para análise da área óssea.....	46
Figura 6	Aumento da área de vasos sanguíneos e diminuição do número de perfil nuclear no ligamento periodontal dos grupos subluxação e subluxação com oclusão traumática comparados ao grupo controle nos períodos de 7 e 21 dias. HE. Objetiva de 100X. Vaso sanguíneo (VS), Perfil Nuclear (*)......	53
Figura 7	Diminuição da área de fibras colágenas coradas em azul pelo tricrômico de masson e aumento da área de substância fundamental amorfa no Ligamento periodontal (LP) nos grupos subluxação e subluxação com oclusão traumática comparados ao grupo controle nos períodos de 7 e 21 dias. TM. Objetiva de 40X. Osso alveolar (OA), Dentina (D), Ligamento	

periodontal

(LP)..... 54

Figura 8 Diminuição da área óssea do septo Interradicular nos grupos subluxação e subluxação com oclusão traumática comparados ao grupo controle nos períodos de 7 e 21 dias. HE. Objetiva de 20X. Osso alveolar (OA)..... 56

Figura 9 Aumento das células TRAP positivas ao redor da raiz distal do 1ºMSD nos grupos subluxação e subluxação com oclusão traumática comparados ao grupo controle nos períodos de 7 e 21 dias. HE. Objetiva de 20X. Osso alveolar (OA), Dentina (D), Ligamento periodontal (LP), Células TRAP positivas (seta preta)..... 57

Figura 10 Aumento das células TRAP positivas no septo interradicular do 1ºMSD nos grupos subluxação e subluxação com oclusão traumática comparados ao grupo controle nos períodos de 7 e 21 dias. HE. Objetiva de 20X. Osso alveolar (AO), Células TRAP positivas (seta preta)..... 58

Figura 11 Reabsorção radicular com cimento neoformado (grupo S) e sem cimento neoformado (Grupo S+OT). HE. Objetiva de 40X..... 61

Lista de Tabelas

Tabela 1	Análise estatística dos eventos histomorfométricos associados ao ligamento periodontal e osso alveolar nos três grupos experimentais (Kruskal-Wallis e Dunn post hoc teste com nível de significancia de 5%).....	51
Tabela 2	Distribuição dos escores e análise estatística dos detalhes histomorfométricos na raiz dentária após teste Kruskal-Wallis e Dunn post hoc ao nível de significancia de 5%.....	60

Lista de Abreviaturas

C-Cimento

Cm – Centímetro, equivale a centésima parte do metro.

cN - CentiNewton, unidade de força

D- Dentina

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético.

FC- Fibra Colágena

g - Grama.

HE. – Expressa a técnica de coloração das lâminas - Hematoxilina e Eosina.

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio.

I.M.-Intra Muscular

Kg - Unidade fundamental de medida de massa.

KPBS- Tampão fosfato de potássio salino

LP – Ligamento Periodontal

M – molar.

mg – Miligramas, equivalente à milésima parte do grama.

mg/Kg – Miligramas por quilo.

min.- Minuto.

mL – Mililitros.

mm - Milímetro, equivalente a milésima parte do metro.

mm³ - milímetro cúbico..

°C - Grau Celsius.

AO- Osso alveolar.

OT- Oclusão Traumática

P - Polpa

PBS- tampão fosfato de sódio.

pH- potencial Hidrogeniônico.

PN – Perfil nuclear

RANKL – Receptor ativador de NF-Kappa B ligante.

S – Subluxação

SFA- Substância Fundamental Amorfa

S+OT – Subluxação com oclusão traumática

TRAP – Tartrate-Resistent Acid Phosphatase

TM. – Tricrômico de Masson

U.I/mL - Unidades Internacionais por mililitro

µg/mL – Microgramas por mililitros.

µL – microlitro.

µm- micrometro.

µm²- micrometro quadrado

VS- Vaso sanguíneo

1º MSD – Primeiro molar superior direito

Sumário

INTRODUÇÃO.....	31
PROPOSIÇÃO	34
MATERIAL E MÉTODO	36
RESULTADOS	51
DISCUSSÃO.....	63
CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS	69
APÊNDICE - Ilustração dos procedimentos experimentais.....	78
ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética no Uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba	82
ANEXO B- Ilustração do material e método.....	83
ANEXO C - Normas do periódico “Dental Traumatology”	85

Introdução

INTRODUÇÃO

A subluxação é uma injúria que afeta as estruturas de suporte do dente. Clinicamente apresenta aumento da mobilidade; posição normal no arco dentário sem deslocamento vertical e/ou horizontal do dente no alvéolo (1-6); sangramento ao redor da gengiva marginal e sensibilidade a mastigação e aos testes de percussão (7). Contudo, em alguns casos, pode ocorrer um edema na região apical e o dente pode apresentar uma discreta extrusão (7). Histologicamente, a subluxação provoca alterações no ligamento periodontal como hemorragia, fibras do ligamento periodontal estiradas, rompidas ou comprimidas, destruição celular e edema (8).

As injúrias nos dentes e tecidos periodontais após o trauma dentário são determinadas pela intensidade e direção do impacto e pela resiliência das estruturas envolvidas (9); influenciando na grande variação da prevalência de lesões como concussão (14% a 27%), subluxação (17% a 77%) e a luxação (20% a 69%) (10 -13).

O tratamento de subluxações de dentes permanentes (14) normalmente exige apenas contenção flexível por até 2 semanas para oferecer conforto para o paciente, com acompanhamento durante 4-8 semanas (6,7,14,15). Entretanto alguns autores ressaltam a importância do ajuste oclusal (6 e 7), prescrição de um anti-inflamatório por 3 a 4 dias e acompanhamento de 1 a 2 anos (7).

Dentes permanentes subluxados apresentam risco de reabsorção de superfície (3,6%), reabsorção inflamatória (0,2%-0,6%), anquilose (0,6 %) e perda de osso marginal (0,6%) (16-19). A subluxação em dentes com o desenvolvimento radicular incompleto apresenta um aumento de reabsorção inflamatória (1,7%) (19).

A oclusão traumática pode interferir na saúde periodontal por ser capaz de afetar a mobilidade dental e a profundidade clínica de sondagem (20,21) e causar

histologicamente alterações morfofuncionais, tais como desorientação e uma diminuição nas fibras colágenas (22,23), a mudança no alinhamento das fibras periodontais (24,25), um aumento no número de fibroblastos (22), a atividade dos osteoclastos elevada (22,23,24), trombose venosa (22) , e necrose das células no ligamento periodontal (22).

O reparo do ligamento periodontal e o suprimento neurovascular da polpa determinam o prognóstico do tratamento dos dentes lesados com subluxação (26). Uma vez que a oclusão pode interferir nestes fatores é importante o estudo da influência da oclusão traumática como fator externo no sucesso do tratamento das subluxações.

Proposição

PROPOSIÇÃO

Avaliar a influência da oclusão traumática no processo de reparo do periodonto em dentes submetidos à subluxação, por meio de análises histomorfométricas e imunoistoquímica para detecção de TRAP.

Material e Método

MATERIAL E MÉTODO

1. Animais e procedimentos cirúrgicos

Os protocolos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (UNESP) sob o número do processo 2014/00795 (ANEXO A).

Foram utilizados 90 ratos, fêmeas, Wistar adulto-jovens (*Rattus norvegicus*) com 12 semanas de vida, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (UNESP). Os animais foram transferidos para o Biotério de manutenção do Departamento Cirurgia e Clínica Integrada de Odontologia de Araçatuba (UNESP) cinco dias antes do experimento e acondicionados em gaiolas, cada uma com cinco animais. Foram 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.

Para os procedimentos experimentais, os animais foram previamente anestesiados (I.M.) com solução de cloridrato de ketamina (80 mg/kg, Vetanarcol, Laboratórios König, Argentina) e xilazina (10 mg/kg, Coopazine, Coopers, São Paulo, Brasil).

A subluxação foi experimentalmente induzida pela aplicação de uma força aguda ocluso-gengival na superfície oclusal do primeiro molar superior direito utilizando o método proposto por Pereira et al., 2010 (27). Após a anestesia, os animais foram colocados em uma mesa cirúrgica em decúbito dorsal e tiveram suas patas traseiras e dianteiras presas com um velcro (VELCRO®).

Durante o método experimental para induzir o trauma dentoalveolar, a boca foi mantida aberta por anéis posicionados nos incisivos e um dispositivo de fixação

superior manteve a cabeça imobilizada. O dispositivo proposto no presente estudo consiste basicamente de duas partes: um tensiômetro (Morelli , Sorocaba , SP, Brasil - código 72.02.006) e um suporte com eixos ajustáveis de aço galvanizado. Uma das extremidades do tensiômetro foi modelada para uma forma redonda com resina acrílica (Orto-Class; Clássico, São Paulo, SP, Brasil). Deste modo , quando a extremidade oposta do tensiômetro foi esticada e, em seguida, liberada a extremidade adaptada em resina acrílica transmitiu um impacto correspondente à força na escala graduada do tensiômetro. A fim de padronizar a direção da força aplicada e da posição da extremidade adaptada – resina acrílica sobre o dente a ser submetido ao trauma, o tensiômetro foi preso em um suporte de aço galvanizado totalmente articulado. Este suporte era constituído por uma haste vertical de 30 cm fixada sobre uma base retangular medindo 15 X 7,5 cm, uma haste horizontal de 30 cm ligada a haste vertical por um conector intermediário de 6,0 cm, e outro conector em forma de punho de rosca que estava ligado a uma das extremidades do eixo horizontal, responsáveis pelo ajuste vertical e fixação do tensiômetro. A força aplicada foi de 900 cN nos grupos experimentais.

A oclusão traumática foi induzida pelo método descrito por Sodeyama et al., 1996 (28), Kawamoto e Nagaoka 2000 (29), Kaku et al., 2005 (30) e Wan et al., 2012 (31). Nesse método, a oclusal do primeiro molar superior direito foi elevada utilizando um preenchimento direto com resina composta para criar uma mesa oclusal plana e alta na cúspide oclusal mais alta. Para isso, antes da restauração, foram confeccionadas micro retenções a nível de esmalte com brocas Carbide ¼ FG (Beavers Dental, Sybron, Morrisburg, Canadá) e alta rotação sob irrigação no sulco principal desse dente. Em seguida, após limpar a superfície com pedra pomes, água e uma escova de Robson acoplada à baixa rotação, aplicou-se primeiro o ácido fosfórico 37% para esmalte e

dentina (FGM, Joinville, Santa Catarina, Brasil) durante 30 segundos, lavou-se abundantemente com água, secou-se a superfície e em seguida aplicou-se com um microbrush (Microbrush ® International, Grafton, EUA) o adesivo fotopolimerizável Scotchbond Multi-Purpose (3M ESPE, Sant Paul, MN 55144, EUA). Após a fotopolimerização do sistema adesivo com o fotopolimerizador de luz alógena (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) durante 20 segundos, colocou-se uma camada de resina composta fotopolimerizável Estelite (Tokuyama Dental Corp, Osaka, Japão) sobre essa superfície oclusal, depois um pedaço de fio de aço de 0,20 milímetros (0,008") (Morelli, Sorocaba, São Paulo, Brasil) sobre essa primeira camada de resina para reforçá-la e diminuir o desgaste e depois mais uma camada de resina composta, fotopolimerizando todo esse preenchimento por 40 segundos.

O animais foram distribuídos em 3 grupos: controle (C), subluxação (S), e subluxação com oclusão traumática (S+OT) com 15 animais para cada período estudado (7 dias e 21dias).

Grupos Experimentais:

- a. C-Grupo Controle (30 ratos) – estes animais não foram submetidos às condições experimentais, sendo utilizados para comparação dos aspectos normais.
- b. S-Grupo subluxação (30 ratos) – subluxação no primeiro molar superior direito, sem alteração oclusal intencional;
- c. S+OT-Grupo subluxação com oclusão traumática (30 ratos) – subluxação no primeiro molar superior direito e alteração da superfície oclusal do mesmo primeiro molar superior direito com resina composta.

Os animais foram excluídos no caso de morte por causas naturais, ou perda da plataforma oclusal de resina composta.

1.1 Perfusão transcardíaca e processamento histológico

Para a perfusão transcardíaca, os animais foram anestesiados com solução de xilazina e ketamina. Os animais receberam previamente injeção intraventricularmente de heparina (0,1 ml / 5.000 U.I/ml), após 10 segundos, foram perfundidos, via aorta, com solução salina a 0,9% (100ml), seguido de solução fixadora (300 ml) de paraformaldeído (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a 4% em tampão fosfato de sódio (PBS) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 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 e submetidos à descalcificação em EDTA a 10% em PBS, durante 20 dias e lavadas exaustivamente em PBS.

Os espécimes foram desidratados em soluções crescentes de alcoóis, diafanizadas em xilóis, impregnadas em parafina de baixa temperatura de fusão (56-58 °C) durante 3 horas e inclusas com orientação pré-estabelecida e padronizada. Os cortes histológicos de 4 µm de espessura foram obtidos, no sentido transversal, em micrótomo rotativo automático (Leica SMR 2000), transferidos em banho-maria (40-50 °C) e coletados em lâminas revestidas com poli-L-lisina ou silanizadas.

Os cortes histológicos coletados em lâminas revestidas com poli-L-lisina foram submetidos à coloração de hematoxilina-eosina (HE) e tricrômico de masson (TM) para análise histológica qualitativa e quantitativa em microscopia de luz. Os cortes histológicos coletados em lâminas silanizadas foram submetidos à imunoistoquímica para detecção da TRAP.

1.2 Histoquímica para detecção da TRAcP

A atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio. As lâminas passaram pela etapa de recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0). Os anticorpos primários utilizados foram contra a TRAP (fosfates resistente ao tartarato) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), com o objetivo de se analisar as respostas celulares quanto à atividade osteoclástica ativa. Foram realizados experimentos de imunistoquímica utilizando como método de detecção a imunoperoxidase. Foi utilizado o anticorpo secundário biotinilado anti-cabra produzido em coelho (Pierce Biotechnology, Rockford, USA), o amplificador foi a Streptavidina e Biotina (Dako, Santa Clara, USA) e a diaminobenzidina (Dako, Santa Clara, USA) como cromógeno.

2. Forma de análise dos resultados

2.1-Análise histológica

Os 3 cortes histológicos transversais de 4µm de espessura, com distância de 40µm entre eles, da porção cervical do 1ºMSD e tecidos circundantes foram analisados em campo claro com auxílio de um microscópio Aristoplan (Leica - Aristoplan, Wetzlar, Alemanha) acoplado a uma câmera digital Axiocam MRc (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Alemanha). Os campos visuais das estruturas de cada animal foram obtidos com as objetivas de 2,5x, 20x, 40x e 100x utilizando o software Axionvision Rel 4.0 (Carl Zeiss, GmbH, Alemanha), alterando o brilho e contraste para realçar as células e tecidos.



Fig. 1. Corte histológico transversal do primeiro molar superior direito corado com hematoxilina e eosina. HE. Objetiva de 2,5x. 1 a 5 = raízes analisadas. P = polpa, D = dentina, C = cemento, LP = ligamento periodontal e OA = osso alveolar. Retângulos brancos = locais do ligamento peridontal onde foram analisadas as porcentagens de fibras colágenas, vasos sanguíneos e substância fundamental amorfa. Retângulo preto = local usado para análise da área óssea. Linhas amarelas = onde foram realizadas as medidas da largura do ligamento periodontal.

2.2 Análises histológicas qualitativas e quantitativas

Na análise quantitativa foi considerada porcentagem relativa da área ocupada por fibras colágenas (FC), vasos sanguíneos (VS) e substância fundamental amorfa (SFA) do LP, largura do LP, área óssea da região central do septo alveolar, número de células clásticas e perfis nucleares (PN), como também a presença de reabsorção radicular e anquilose.

Os cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina foram usados para a análise de vasos sanguíneos, substância fundamental amorfa, perfis nucleares, largura

do ligamento periodontal, área óssea, reabsorção radicular e anquilose. Já os cortes submetidos à coloração de tricrômico de masson foram usados para análise de fibras colágenas e a imunohistoquímica para detecção de TRAP foi usada para contagem de células clásticas.

O examinador não sabia a que grupo as imagens pertenciam, a fim de evitar um viés na análise.

2.2.1 Análise quantitativa da porcentagem de fibras colágenas, vasos sanguíneos, substância fundamental amorfa.

Para a análise quantitativa da porcentagem de fibras colágenas, vasos sanguíneos e substância fundamental amorfa, as imagens foram processadas no programa de análise de imagens ImageJ (National Institutes of Health, EUA). A mensuração das fibras colágenas foi realizada em uma área de $50524\mu\text{m}^2$ da porção distal do ligamento periodontal das raízes do 1ºMSD; em uma ampliação de 680x. Já a mensuração dos vasos sanguíneos e substância fundamental amorfa foram realizadas em uma área de $7928\mu\text{m}^2$ da porção distal do ligamento periodontal das raízes do 1ºMSD; em uma ampliação de 1700x.

Para calcular a área ocupada pelos vasos sanguíneos, estas estruturas foram delimitadas, e em seguida calculadas a porcentagem em relação à área total (Fig. 2). Para a análise quantitativa da porcentagem de fibras colágenas (Fig. 3) e substância fundamental amorfa foi utilizada uma ferramenta do ImageJ que por contraste de cor forneceu a porcentagem das mesmas na região analisada.

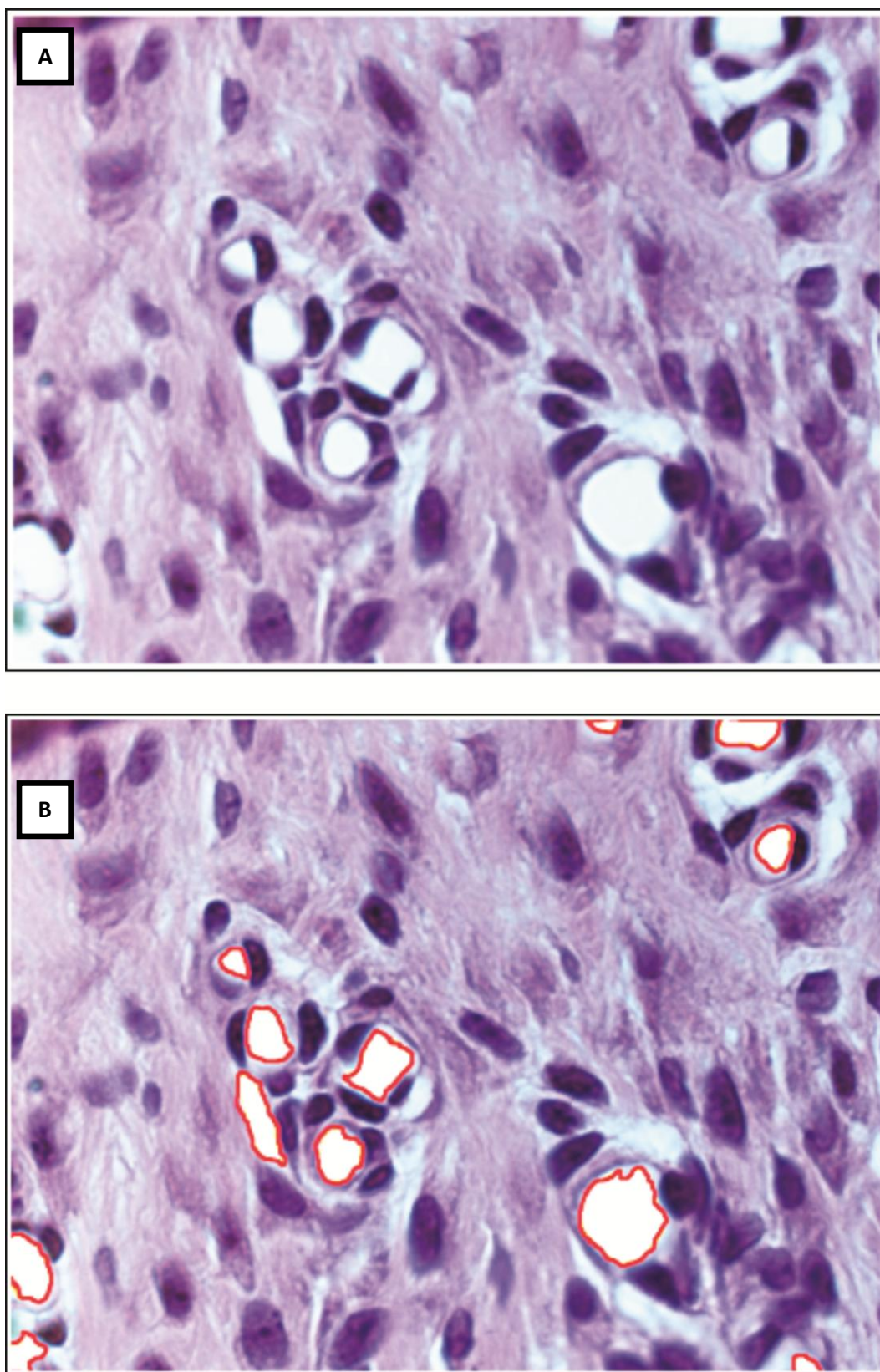


Fig 2. Ligamento periodontal entre as raízes do 1º MSD submetido à coloração com HE (Objetiva de 100x). A - fotografia original; B – análise da área dos vasos sanguíneos (vasos sanguíneos delimitados em vermelho para mensuração).

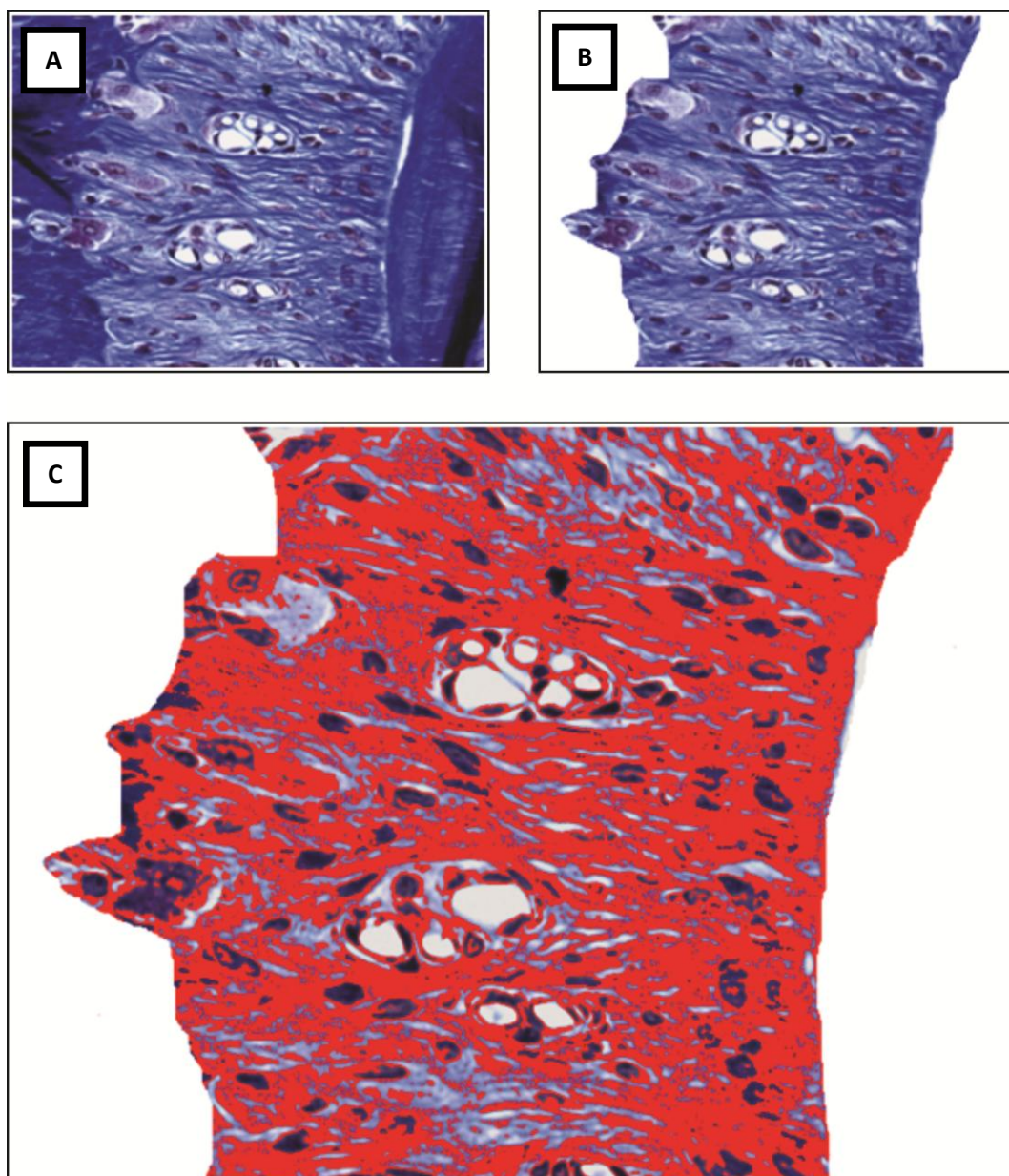


Fig. 3. Ligamento periodontal do 1º MSD submetido à coloração com tricrômico de masson (Objetiva de 40x). A – fotografia original; B – fotografia formatada, remoção das áreas correspondentes á dentina e osso; C – fotografia editada pelo programa IMAGE J para análise da área de fibras colágenas.

2.2.2 Análise quantitativa do número de perfis nucleares do ligamento periodontal.

Os perfis Nucleares foram contados no ligamento periodontal em uma área de $7928 \mu\text{m}^2$ da porção distal do ligamento periodontal das raízes do 1ºMSD; em uma ampliação de 1700X. Para a contagem das células utilizou-se uma ferramenta do

Programa Image J chamado de “Mult Point” que impossibilitou a contagem de uma célula duas vezes. (Fig. 4)

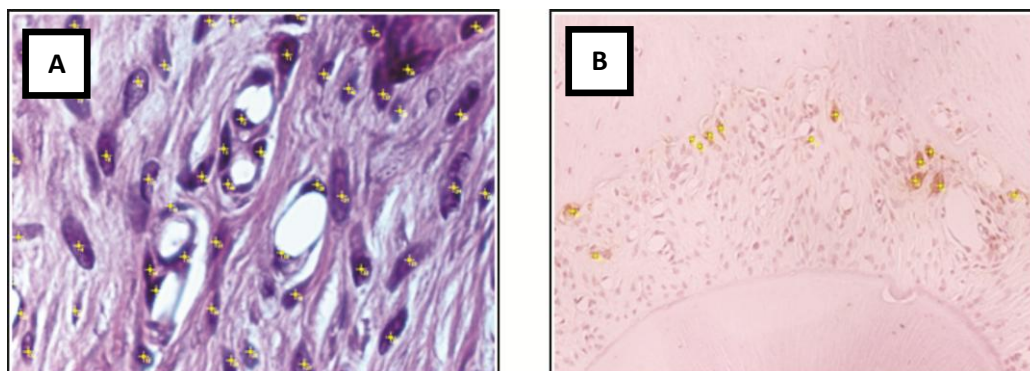


Fig. 4. Ligamento periodontal do 1º MSD. A – fotografia original, coloração com HE, durante a contagem dos perfis nucleares no programa IMAGE J usando a ferramenta de marcação “Mult point” (Objetiva de 100x); B – fotografia original, coloração com HE, imunohistoquímica para detecção de TRAP durante a contagem de células TRAP positivas no programa IMAGE J usando a ferramenta de marcação “Mult point” (Objetiva de 20x).

2.2.3 Análise quantitativa da área óssea do septo alveolar.

As imagens do septo alveolar do primeiro molar superior foram obtidas com a objetiva de 20X, e analisadas por meio do programa Axionvision Rel 4.0 (Carl Zeiss, GmbH, Alemanha). Para a análise quantitativa, as imagens foram processadas usando o ImageJ e a quantificação da área óssea foi realizada em uma área de 197589 μm^2 da porção central do septo interradicular do 1ºMSD; em uma ampliação de 350X. Para isso foram removidas todas as regiões que não eram de osso. Em seguida, as imagens foram processadas no image J, que por contraste de cor determinou a porcentagem de osso presente nesta área de 197589 μm^2 (fig. 5).

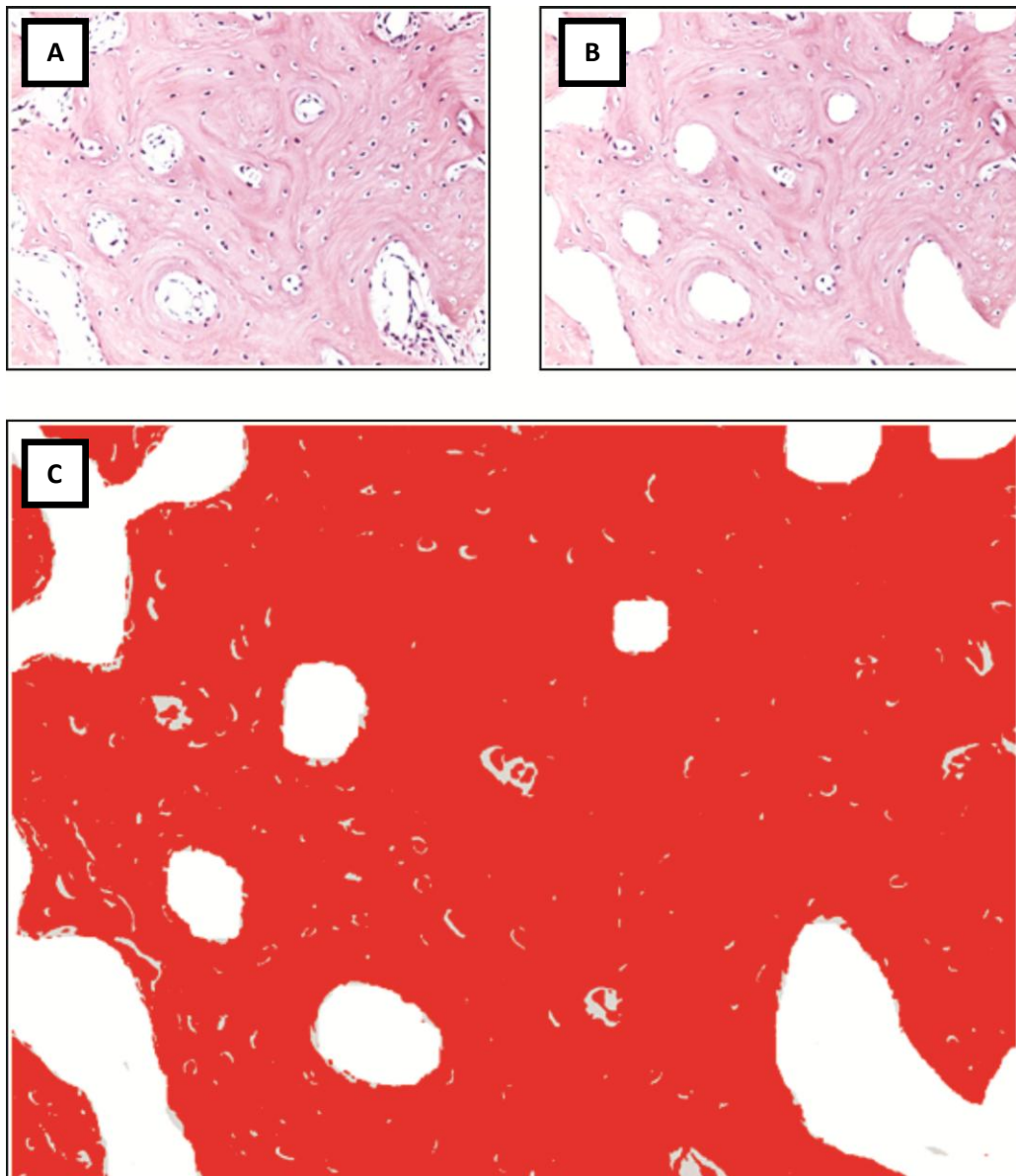


Fig. 5. Osso alveolar entre as raízes do 1º MSD submetido à coloração com HE (Objetiva de 20x). A – fotografia original; B – fotografia formatada, remoção das áreas de vasos sanguíneos para análise da área óssea; C – fotografia editada pelo programa IMAGE J para análise da área óssea.

2.2.4 Análise quantitativa da largura do LP

A largura média do ligamento periodontal em todas as raízes do 1ºMSD foi calculada pela soma da largura do ligamento periodontal nas superfícies mesial, distal, vestibular e lingual e o valor foi dividido por quatro (Fig. 1). Essa quantificação foi em uma ampliação de 50x.

2.2.5 Análise quantitativa de reabsorção radicular e anquilose dentária das raízes do 1ºMSD

Análises histomorfológicas

Para a quantificação das ocorrências histomorfológicas foram atribuídos escores de 1 a 4 aos diferentes eventos abaixo listados, onde 1 corresponde ao melhor resultado e 4 ao pior, ocupando os escores 2 e 3 posições intermediárias Panzarini et al., 2007 (32).

Eventos considerados para a análise dos resultados:

1) Raiz do dente

1.1) Reabsorção radicular ativa e inativa

- 1 - Ausência de reabsorção radicular e ou reabsorções reparadas;
- 2 - Áreas de reabsorção inativa (ausência de células clásticas);
- 3 - Pequenas áreas de reabsorções ativas;
- 4 - Extensas áreas de reabsorção ativa.

1.2) Extensão da reabsorção radicular. Em lâminas representativas foram feitas medidas (em micrometros) da extensão das áreas de reabsorção. A medida dos valores obtidos por vestibular e por lingual permitiu a atribuição dos seguintes escores.

- 1 - Ausência de reabsorção;
- 2 - Extensão média de 1 a 1000 micrometros;
- 3 - Extensão média de 1001 a 5000 micrometros;
- 4 - Extensão média maior que 5001 micrometros.

1.3) Profundidade de reabsorção radicular. Em lâminas representativas foram feitas medidas (em micrometros) das maiores profundidades das áreas de reabsorção. A medida dos valores obtidos permitiu a atribuição dos seguintes escores.

- 1 - Ausência de reabsorção;
- 2 - Profundidade média de 1 a 100 micrometros;
- 3 - Profundidade média de 101 a 200 micrometros;
- 4 - Profundidade média maior que 201 micrometros.

1.4) Reparo nas áreas de reabsorção radicular

- 1 - Ausência de reabsorção ou deposição de cimento neoformado em toda extensão das áreas reabsorvidas;
- 2 - Deposição de cimento neoformado em metade ou mais da extensão das áreas reabsorvidas;
- 3 - Deposição de cimento neoformado em menos da metade das áreas reabsorvidas;
- 4 - Ausência de deposição de cimento neoformado junto às áreas reabsorvidas.

2) Anquilose

- 1 - Ausência de anquilose;
- 2 - Pequenos pontos de anquilose;
- 3 - Um terço da raiz está anquilosada;

4 - Mais de um terço da raiz está anquilosada.

2.2.6 Análise Imunoistoquímica

As células clásticas (células TRAcP positivas) foram contadas em uma área de $197589 \mu\text{m}^2$ em torno de todas as raízes e no centro do septo interradicular com uma ampliação de 350X do 1ºMSD. Assim a contagem dessas células foi realizada em duas áreas distintas: na superfície dental (dentina / cimento) e na superfície do osso alveolar. Para a contagem das células foi utilizada uma ferramenta do Programa Image J chamado de “Mult Point” que impossibilitou que uma mesma célula fosse contada duas vezes. (Fig. 4)

2.3 Análise Estatística

Os dados foram analisados utilizando o programa Graph Pad Prism, para $\alpha=0,05$. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com Dunn post hoc teste para comparações entre grupos. Os dados foram expressos em média.

Resultados

RESULTADOS

Tabela 1. Análise estatística dos eventos histomorfométricos associados ao ligamento periodontal e osso alveolar nos três grupos experimentais (Kruskal-Wallis e Dunn post hoc teste com nível de significância de 5%).

P	Variáveis	Grupos		
		C	S	S + OT
7 D		Média	Média	Média
	Espessura LP(μm)	119596,91 ^A	160469,16 ^B	215503,37 ^C
	Área de VS (%)	0,89 ^A	15,15 ^B	12,92 ^B
	Área de SFA (%)	20911,31 ^A	38498,45 ^B	51984,54 ^C
	Área de FC (%)	56,79 ^A	32,37 ^B	29,52 ^B
	PN (n)	65,21 ^A	43,08 ^B	39,91 ^B
	TRAP-LP (n)	5,21 ^A	20,05 ^B	29,3 ^B
	TRAP-Septo ósseo (n)	1,71 ^A	41,08 ^B	45,22 ^B
	Área óssea(μm^2)	75830,02 ^A	29711,20 ^B	13797,00 ^C
P	Variáveis	C	S	S + OT
21 D		Média	Média	Média
	Espessura LP(μm)	122699,62 ^A	150924,00 ^{A/B}	242551,84 ^B
	Área de VS (%)	3,20 ^A	7,64 ^{A/B}	11,21 ^B
	Área de SFA (%)	19902,46 ^A	39970,84 ^B	47372,52 ^C
	Área de FC (%)	47,54 ^A	60,29 ^B	24,98 ^C
	PN (n)	69,39 ^A	56,78 ^B	40,80 ^C
	TRAP-LP (n)	6,46 ^A	22,35 ^B	21,91 ^B
	TRAP-Septo ósseo (n)	2,06 ^A	34,42 ^B	36,95 ^B
	Área óssea(μm^2)	79140,40 ^A	34011,91 ^B	7241,90 ^C

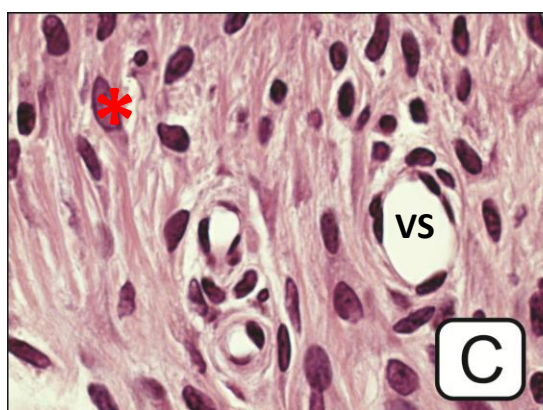
C-Grupo controle, S-grupo subluxação, S+OT- grupo subluxação com oclusão traumática, DP - Desvio padrão, P- período, LP-ligamento periodontal, PN-perfil nuclear, FC-fibras colágenas, SFA-substância fundamental amorfa. *Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos.

No período de 7 dias, os grupos experimentais mostraram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle em todas as variáveis histométricas avaliadas.

Após 7 dias do experimento, houve um aumento significativo da espessura do ligamento periodontal nos grupos de subluxação (34%) e subluxação com oclusão traumática (80%) quando comparados ao grupo controle e entre si (46%) (Tabela 1).

Neste contexto, a área de vasos sanguíneos e substância fundamental amorfa aumentaram significativamente, e a área de fibras colágenas e o número de perfis nucleares diminuíram em ambos os grupos experimentais, sem diferença significativa entre eles (Tabela 1) (Fig. 6 e 7).

7 DIAS



21 DIAS

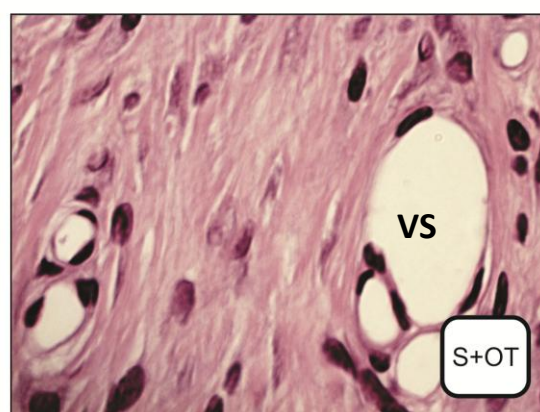
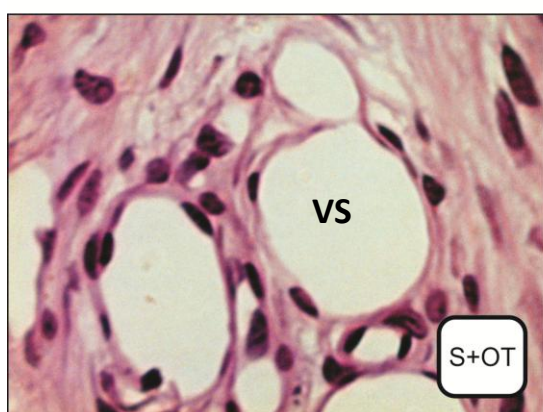
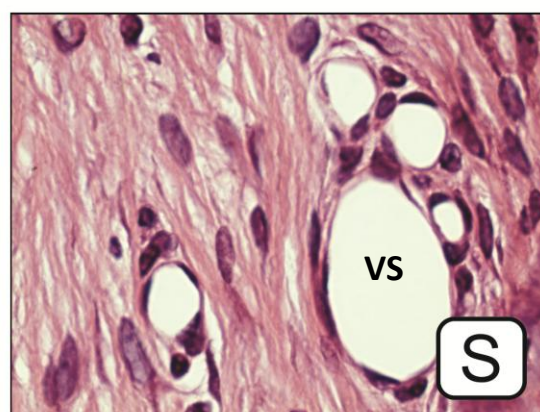
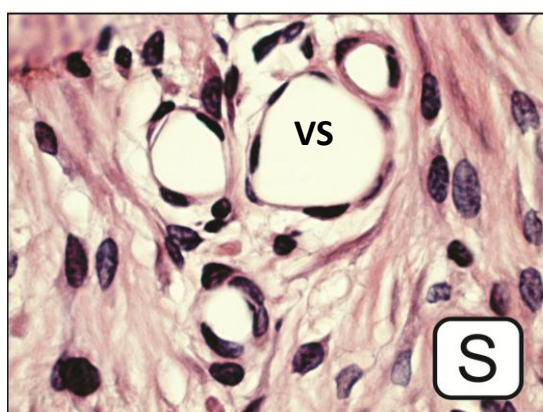
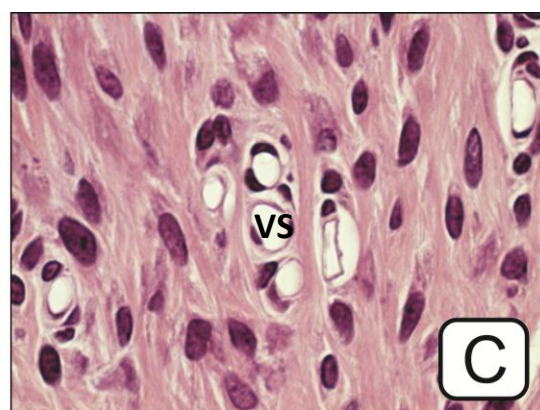
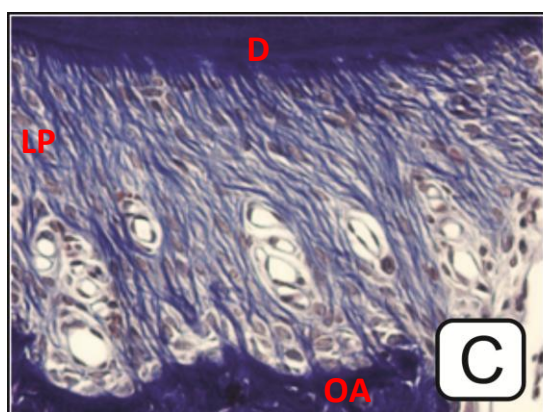


Fig. 6. Aumento da área de vasos sanguíneos e diminuição do número de perfil nuclear no ligamento periodontal dos grupos subluxação e subluxação com oclusão traumática comparados ao grupo controle nos períodos de 7 e 21 dias. HE. Objetiva de 100X. Vaso sanguíneo (VS), Perfil Nuclear (*).

7 DIAS



21 DIAS

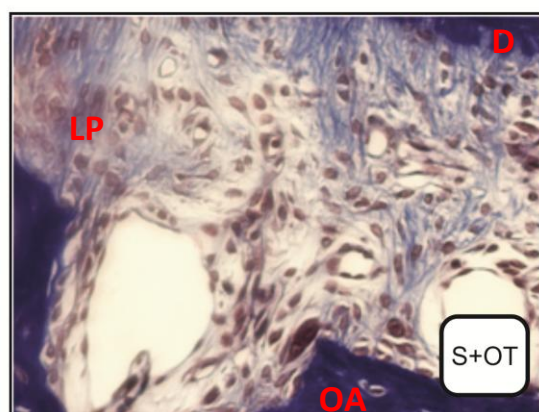
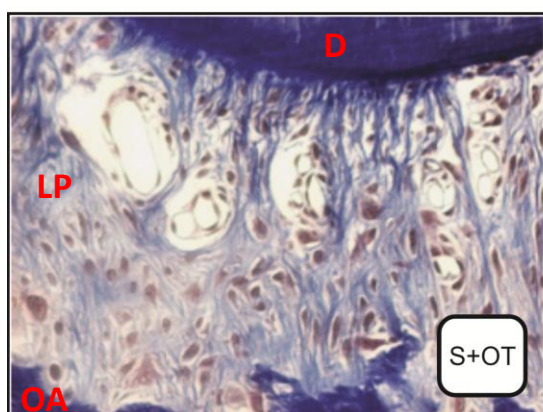
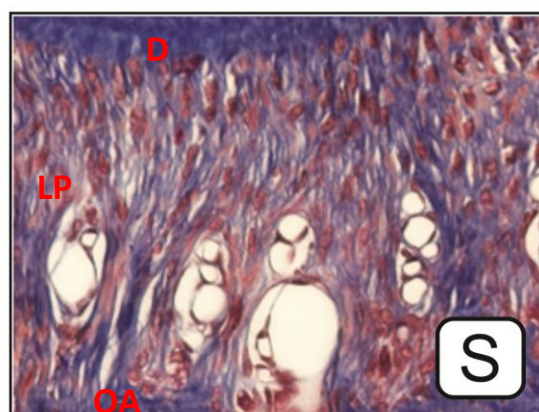
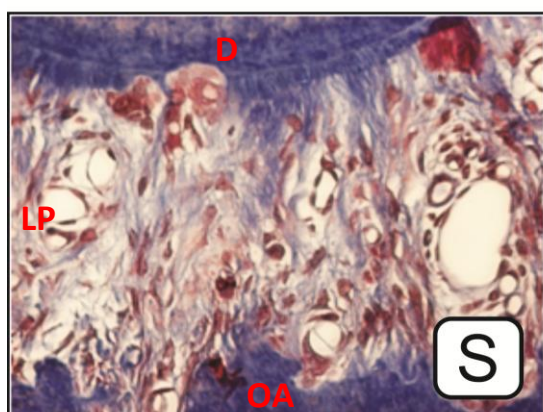
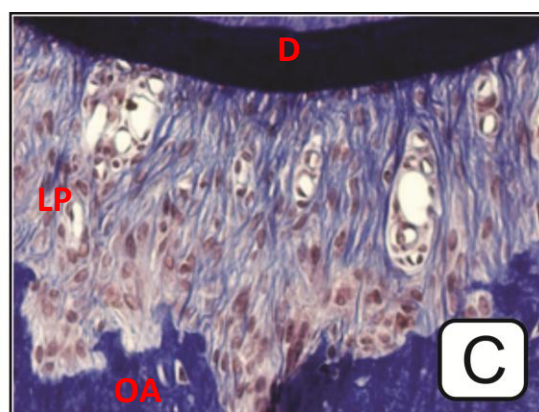


Fig. 7. Diminuição da área de fibras colágenas coradas em azul pelo tricrômico de masson e aumento da área de substância fundamental amorfa no Ligamento periodontal (LP) nos grupos subluxação e subluxação com oclusão traumática comparados ao grupo controle nos períodos de 7 e 21 dias. TM. Objetiva de 40X. Osso alveolar (OA), Dentina (D), Ligamento periodontal (LP).

Nos dois grupos experimentais, houve um aumento do número de células TRAP positivas tanto no ligamento periodontal (4x) como no osso do septo alveolar (25x), porém essa diferença não foi significativa entre os dois grupos experimentais (Grupo Subluxação e grupo Subluxação com oclusão traumática), originando uma diminuição significativa da área óssea na presença de subluxação com ou sem a oclusão traumática e entre esses dois grupos experimentais (Tabela 1). A subluxação provocou uma redução significativa dessa área óssea de 60,8% em relação ao grupo controle e a oclusão traumática agravou essa condição em cerca de 21% no período de 7 dias quando comparado ao grupo subluxação (Fig. 8, 9 e 10).

7 DIAS

21 DIAS

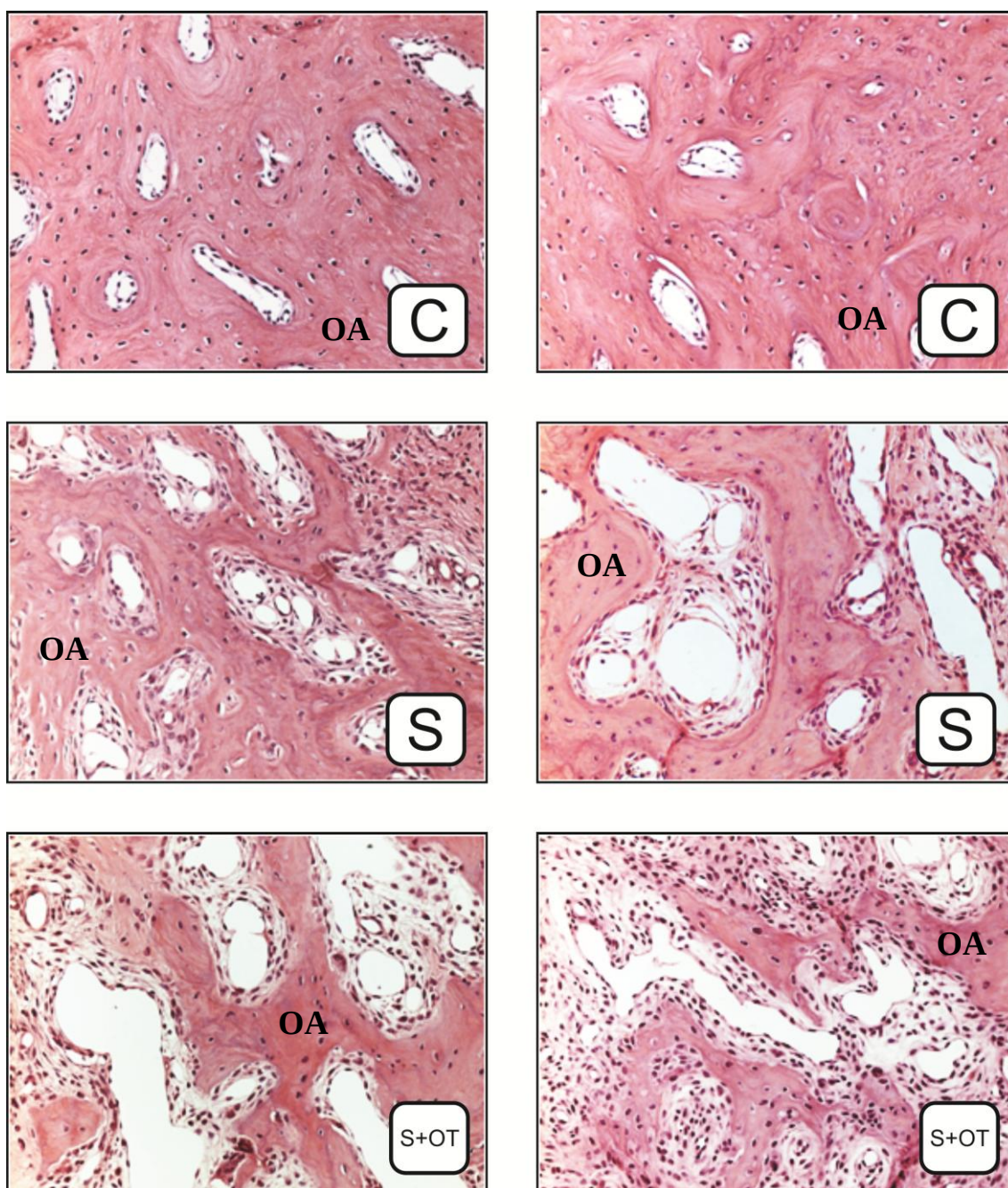


Fig. 8. Diminuição da área óssea do septo Interradicular nos grupos subluxação e subluxação com oclusão traumática comparados ao grupo controle nos períodos de 7 e 21 dias. HE. Objetiva de 20X. Osso alveolar (OA).

7 DIAS

21 DIAS

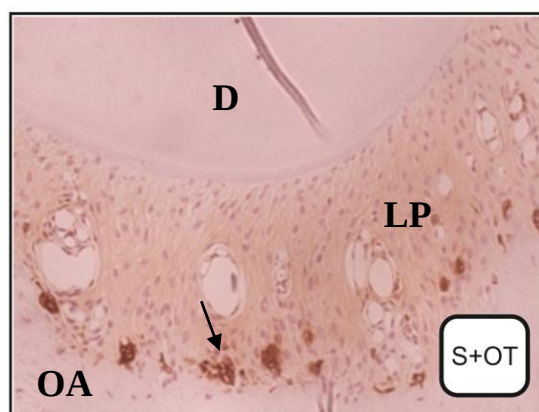
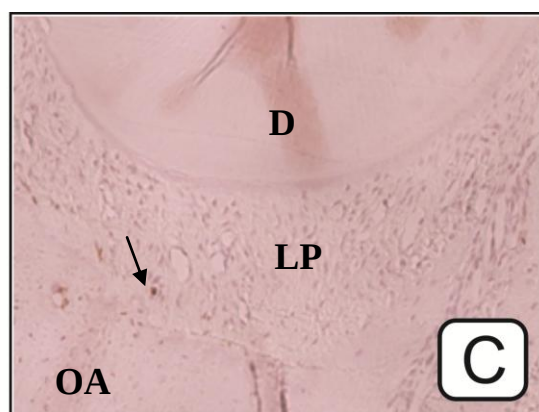


Fig. 9. Aumento das células TRAP positivas ao redor da raiz distal do 1ºMSD nos grupos subluxação e subluxação com oclusão traumática comparados ao grupo controle nos períodos de 7 e 21 dias. HE. Objetiva de 20X. Osso alveolar (OA), Dentina (D), Ligamento periodontal (LP), Células TRAP positivas (seta preta).

7 DIAS

21 DIAS

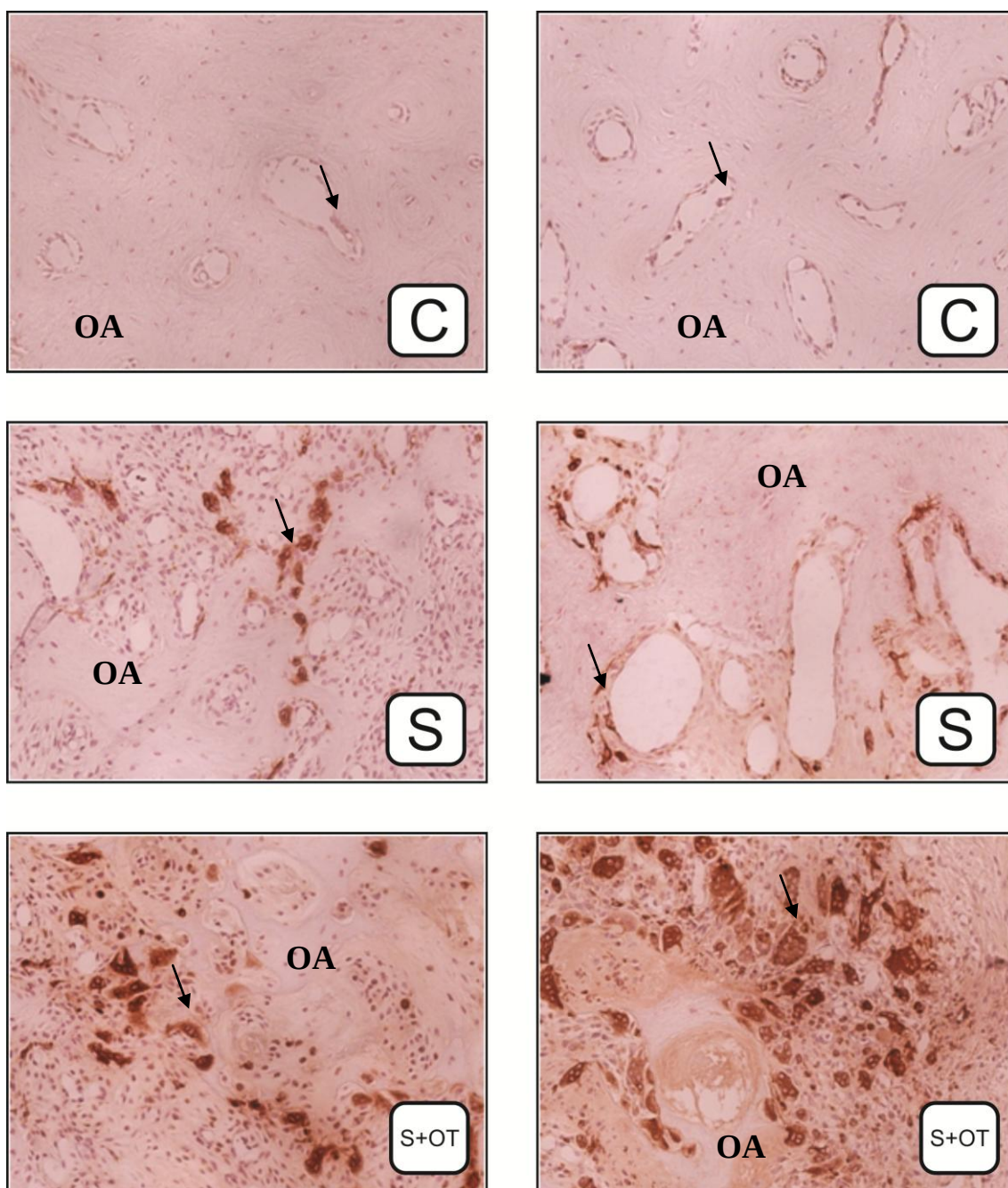


Fig. 10. Aumento das células TRAP positivas no septo interradicular do 1ºMSD nos grupos subluxação e subluxação com oclusão traumática comparados ao grupo controle nos períodos de 7 e 21 dias. HE. Objetiva de 20X. Osso alveolar (AO), Células TRAP positivas (seta preta).

Aos 21 dias o aumento da espessura do ligamento periodontal permaneceu significativo somente no grupo subluxação com oclusão traumática quando comparada ao grupo controle (Tabela 1). A porcentagem de fibras colágenas nesse período apresentou-se drasticamente alterada, mostrando um aumento no grupo subluxação e uma redução no grupo subluxação com oclusão traumática, quando comparada ao período de 7 dias (Tabela 1). Já a porcentagem de substância fundamental amorfa manteve o aumento significativo nos dois grupos com maior porcentagem no grupo subluxação com oclusão traumática (Tabela 1). A porcentagem de vasos sanguíneos também permaneceu com um aumento em ambos os grupos experimentais (Tabela 1), contudo esse aumento apresentou-se significativo somente na presença da oclusão traumática nos casos de subluxação (Tabela 1) (Fig. 6 e 7).

O número de perfis nucleares apresenta-se reduzido em ambos os grupos e períodos experimentais com diferenças significativas, mas no período de 21 dias o grupo subluxação apresenta um aumento quando comparado ao mesmo no período de 7 dias (Tabela 1) (Fig. 6).

Nos dois grupos experimentais após 21 dias, também houve um aumento do número de células TRAP positivas tanto no ligamento periodontal (4x) quanto no osso do septo alveolar (16x), contudo também sem diferença significativa entre os dois grupos experimentais (Grupo Subluxação e grupo Subluxação com oclusão traumática). Da mesma forma, aos 21 dias observou-se diminuição significativa da área óssea na presença de subluxação com ou sem a oclusão traumática (Tabela 1). Nesse período de 21 dias, os dentes submetidos apenas a subluxação apresentaram um pequeno aumento na porcentagem da área óssea do septo alveolar, enquanto no grupo submetido a subluxação e oclusão traumática observou-se uma redução de cerca de 52% da área óssea quando comparada ao mesmo grupo no período de 7 dias (Fig. 8, 9 e 10).

Tabela 2. Distribuição dos escores e análise estatística dos detalhes histomorfométricos na raiz dentária após teste Kruskal-Wallis e Dunn post hoc ao nível de significância de 5%.

P	Váriáveis	Score	Grupos		
			C (N)	S (N)	S + OT (N)
7 D	Reabsorção raiz	Ausência de reabsorção	15/15 ^A	11/15 ^{A, B}	6/15 ^B
		Áreas de reabsorção inativa	0/15 ^A	4/15 ^{A, B}	9/15 ^B
	Reabsorção raiz (extensão)	Ausência de reabsorção	15/15 ^A	11/15 ^{A, B}	5/15 ^B
		Extensão média de 1-1000µm	0/15 ^A	4/15 ^{A, B}	10/15 ^B
	Reabsorção raiz (profundidade)	Ausência de reabsorção	15/15 ^A	11/15 ^{A, B}	5/15 ^B
		Profundidade média de 1-100µm	0/15 ^A	4/15 ^{A, B}	10/15 ^B
	Reparo-raiz	Ausência de reabsorção	15/15 ^A	11/15 ^{A, B}	7/15 ^B
		Cimento neoformado em ½ ou mais das áreas reabsorvidas	0/15 ^A	2/15 ^{A, B}	5/15 ^B
		Cimento neoformado em menos da ½ das áreas reabsorvidas	0/15 ^A	2/15 ^A	3/15 ^A
21 D	Reabsorção raiz	Ausência de reabsorção	15/15 ^A	10/15 ^B	9/14 ^B
		Áreas de reabsorção inativa	0/15 ^A	5/15 ^B	5/14 ^B
	Reabsorção raiz (extensão)	Ausência de reabsorção	15/15 ^A	10/15 ^B	4/14 ^B
		Extensão média de 1-1000µm	0/15 ^A	5/15 ^B	10/14 ^B
	Reabsorção raiz (profundidade)	Ausência de reabsorção	15/15 ^A	10/15 ^B	4/14 ^B
		Profundidade média de 1-100µm	0/15 ^A	5/15 ^B	10/14 ^B
	Reparo-raiz	Ausência de reabsorção	15/15 ^A	11/15 ^{A, B}	9/14 ^B
		Cimento neoformado em ½ ou mais das áreas reabsorvidas	0/15 ^A	3/15 ^A	0/14 ^A
		Cimento neoformado em menos da ½ das áreas reabsorvidas	0/15 ^A	1/15 ^{A, B}	5/14 ^{A, B}

C-Grupo controle, S-grupo subluxação, S+OT- grupo subluxação com oclusão traumática. P-período. * Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre os grupos. Em cada grupo e período havia originalmente 15 animais, mas ocorreu perda durante o curso do experimento reduzindo a amostra no tempo de 21 dias para 14 animais.

Após a análise estatística das variáveis avaliadas por scores, observou-se que ocorreu apenas reabsorções radiculares inativas de extensão e profundidade mínima na presença da subluxação com ou sem a OT e embora não tenha ocorrido diferença significativa entre os dois grupos experimentais vê-se que houve um maior número de reabsorção radicular na presença da OT. Com 7 dias apenas o grupo S+OT apresentou reabsorções radiculares significativas em relação ao controle. Com 21 dias observou-se que o grupo S+OT prejudicou o processo de reparo dessas áreas radiculares reabsorvidas, apresentando 100% dessas reabsorções radiculares com cemento neoformado em menos da $\frac{1}{2}$ das áreas reabsorvidas (Tabela 2). Além disso, não houve presença de anquilose em nenhum dos grupos estudados para ambos os períodos experimentais, como também não houve diferença significativa entre os períodos estudados de 7 e 21 dias para todas as variáveis avaliadas por score (reabsorção da raiz, reabsorção da raiz-extensão, reabsorção da raiz-profundidade e reparo-raiz) (Fig 11).

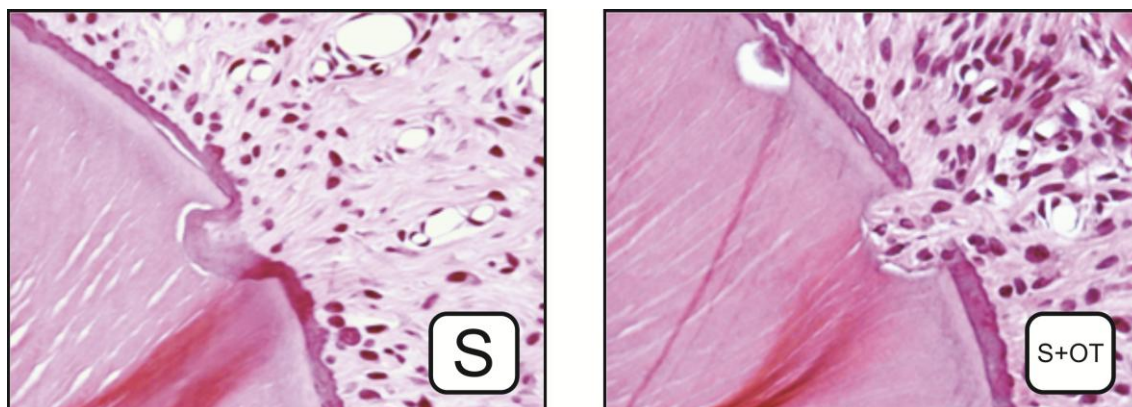


Fig. 11. Reabsorção radicular com cemento neoformado (grupo S) e sem cemento neoformado (Grupo S+OT). HE. Objetiva de 40X.

Discussão

DISCUSSÃO

O reparo do ligamento periodontal e o prognóstico dos tratamentos utilizados após a subluxação tem sido pouco discutidos por estudos prévios (6,7,14,15 e 19), talvez por esta ser considerada uma lesão leve com prognóstico favorável. Contudo, a necrose pulpar, reabsorção radicular inflamatória e anquilose (16-19) são consideradas complicações do reparo do ligamento periodontal, uma vez que comprometem a manutenção do dente por um longo período de tempo (33), que podem ser agravadas por fatores como a ausência de contenção (34,35), infecção do canal radicular (19, 36-39) e a oclusão traumática (40).

Em relação ao método utilizado no presente trabalho, o trauma dentoalveolar experimental induzido pela aplicação de uma força aguda oclusogengival na superfície oclusal do dente do rato (Axial), produziu alterações histológicas compatíveis com as causadas por impactos frontais, como observado na subluxação (14,38). A vantagem deste método utilizado é a padronização da intensidade e direção da força aplicada que permite simular esse tipo de trauma com as mesmas características (27).

Este estudo mostra que, logo após a subluxação, os eventos histológicos encontrados no ligamento periodontal como aumento da área de substância fundamental amorfa e vasos sanguíneos, diminuição da área de fibras colágenas periodontais e perfil nuclear devido à morte celular e liberação de mediadores hialínicos e inflamatórios que induzem a reabsorção óssea e radicular são característicos de um processo de degeneração tecidual (8, 41-46), tendendo a se recuperar e normalizar após o 21º dia do trauma, exceto no grupo que sofreu a subluxação e oclusão traumática ao mesmo tempo. A reabsorção radicular de superfície é frequentemente encontrada em casos de subluxação (16, 17, 18, 19); neste estudo de subluxação em ratos as áreas de reabsorção radicular são geralmente superficiais (profundidade menor que 100µm e extensão

menor que 1000 μ m), e provavelmente seriam difíceis de diagnosticar radiograficamente (19,47). A reabsorção radicular depende da intensidade da OT. Com 7 dias de experimento, a OT gerada naturalmente pela própria subluxação (edema no LP) (7) não foi capaz de causar reabsorções radiculares significativas provavelmente, por ser de menor intensidade que a OT provocada experimentalmente pela resina composta. Esse fato pode ser observado facilmente nesse modelo experimental, uma vez que o grupo subluxação com a oclusão traumática provocou maiores reabsorções radiculares em um menor período de tempo (7dias) do que só o grupo subluxação nesse mesmo período.

A anquilose não foi vista em nenhum dos casos, uma vez que esse método de indução da subluxação não provocou deslocamento do dente de seu alvéolo (27). Além disso, o fato de não ter sido usada a contenção e o estímulo mecânico proveniente das forças oclusais pode ter favorecido esse resultado, uma vez que a contenção prolongada estimula e favorece a ocorrência de anquilose (48,49) e estímulo mecânico influencia na migração ou na proliferação de células do LP (43).

A OT pode ser comparada à aplicação de uma força ortodôntica em dentes subluxados sendo considerado um trauma adicional e mais intenso ao periodonto (14, 50) por exercer uma força intrusiva capaz de não só agravar a lesão gerada pela subluxação, mas também prejudicar seu processo de reparo que deveria ocorrer 10 dias após o trauma (41).

Este atraso, permanência e/ou aumento dos danos do ligamento periodontal, provavelmente acontecem devido à pressão hidrostática aumentada pela presença da oclusão traumática; que na subluxação pode ser causada pela reação inflamatória devido ao rompimento das fibras do LP.

A reabsorção óssea em casos de subluxação é avaliada por poucos autores (19, 33), que consideram sua presença somente no topo da crista óssea, contudo este estudo

mostra que esta reabsorção acontece no osso em toda extensão dentária próximo a raiz radicular, bem como à distância, no centro do septo alveolar; provavelmente pela propagação da pressão hidrostática e estímulo da comunicação celular que trabalham conjuntamente para restabelecer a homeostasia do periodonto (51-53). Dessa forma, pode-se considerar que a própria subluxação pode levar a reabsorção óssea por ser capaz de provocar uma oclusão traumática, através da leve extrusão dentária causada pelo trauma (7).

O aumento dessa pressão hidrostática no ligamento periodontal leva a desorientação, redução e destruição das fibras colágenas (22,23,54), aumento no número e volume dos vasos sanguíneos e necrose das células do ligamento periodontal (22), além disso, estimula a expressão de RANKL nas células endoteliais, inflamatórias e do ligamento periodontal e o aumento da atividade de osteoclastos (22,23,24) que estão envolvidos na reabsorção óssea inflamatória (55), mantendo essa reabsorção óssea ativa até o 21º dia após o trauma dento alveolar e atrasando consequentemente a recuperação até da espessura do LP após a subluxação.

Uma vez que a OT, que pode já existir antes do trauma devido a um hábito parafuncional, iatrogenias (56,57) ou má oclusão, principalmente em crianças pela erupção incompleta e temporária dos primeiros molares permanentes (58-61) ou passar a ocorrer após esse trauma (edema no LP ou uma alteração posicional dento alveolar) (7), o profissional deve ser cauteloso e se atentar ao ajuste oclusal durante o atendimento de pacientes com subluxação dental, pois, embora haja indícios de que a perda óssea causada por oclusão traumática seja considerada total ou parcialmente reversível, a presença da mesma não permite o reparo do ligamento periodontal e a regressão da reabsorção óssea.

Conclusão

CONCLUSÃO

A oclusão traumática agravou os danos no ligamento periodontal, no osso alveolar e na superfície radicular gerados após a subluxação, bem como atrasou o processo de reparo dos mesmos.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Andreasen, JO. Traumatic injuries of the teeth. Copenhagen: Munksgaard, 1981.
2. Andreasen FM, Pedersen BV. Prognosis of luxated permanent teeth—the development of pulp necrosis. *Endod Dent Traumatol* 1985;1:207–20.
3. Andreasen, FM. A histological and bacteriological investigation of pulps extirpated following luxation injuries. *Endod. Dent. Traumatol* 1988;4:170-81.
4. Josell SD, Abrams RG. Managing common dental problems and emergencies. *Pediatr. Clin. North Am* 1991;38:1325-42.
5. Andreasen JO, Andreasen FM, Bakland LK, Flores MT. Traumatic dental injuries – a manual. Oxford, UK: Blackwell Munksgaard; 2003.
6. Andreasen FM, Andreasen JO. Concussion and subluxation. In: Andreasen FM, Andreasen JO, Andersson L.. Textbook and color atlas of traumatic injuries to the teeth. 4th ed. Oxford, UK: Blackwell Munksgaard; 2007. p. 404–10.
7. Araújo MAM, Valera MC. Etiologia e classificação dos traumatismos dentários. In: Araújo, MAM; Valera, MC. Tratamento clínico dos traumatismos dentários. 1º edição. São Paulo: Artes Médicas, 1999. p 1-12. Araújo MAM, Valera MC. Injúrias por luxação. In: Araújo, MAM; Valera, MC. Tratamento clínico dos traumatismos dentários. 1º edição. São Paulo: Artes Médicas, 1999. p 187-196.
8. Miyashin M, Kato J, Takagi Y. Tissue reactions after experimental luxation injuries in immature rat teeth. *Endod Dent Traumatol* 1991;7:26–35.
9. 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.

10. Crona-larsson G, Noren JG. Luxation injuries to permanent teeth – a restrospective study of etiologic factors. *Endod. Dent. Traumatol* 1989;5:176-9.
11. Sae-lim V, Hon TH, Wing YK. Traumatic dental injuries at the accident and emergency Department of Singapore General Hospital. *Endod. Dent. Traumatol* 1995;11(1):32-6.
12. Oulis CJ, Berdouses ED. Dental injuries of permanent teeth treated in private practice in Athens. *Endod. Dent. Traumatol.*, v.12, p. 60-65, 1996.
13. Sae-lim V, Yuen KW. An evaluation of after office hour dental trauma in Singapore. *Endod. Dent. Traumatol* 1997;13:164-70.
14. Flores MT, Andersson L, Andreasen JO, Bakland LK, Malmgren B, Barnett F et al. Guidelines for the management of traumatic dental injuries. I. Fractures and luxations of permanent teeth. *Dent Traumatol* 2007;23:66–71.
15. Diangelis AJ, Andreasen JO, Ebeleseder KA, Kenny DJ, Trope M, Sigurdsson A, Andersson L, Bourguignon C, Flores MT, Hicks ML, 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:1. Fractures and luxations of permanent teeth. *Dent Traumatol*. 2012 Feb;28(1):2-12.
16. Stalhane I, Hedegard B. Traumatized permanent teeth in children aged 7–15 years. Part II. *Swed Dent J* 1975;68:157–69.
17. Andreasen FM. Pulp healing after luxation injuries and root fracture in the permanent dentition. *Endod Dent Traumatol* 1989;5:111–31.
18. Andreasen FM. Pulpal healing after tooth luxation and root fractures in the permanent dentition. Doctoral Thesis, University of Copenhagen, Weiss Bogtrykkeri, Copenhagen 1995. ISBN 87-985538-0-1.

19. Hermann NV, Lauridsen E, Ahrensburg SS, Gerds TA, Andreasen JO. Periodontal healing complications following concussion and subluxation injuries in the permanent dentition: a longitudinal cohort study. *Dent Traumatol*. 2012 Oct;28(5):386-93.
20. Nunn, M.E.; Harrel, S.K. The Effect of Occlusal Discrepancies on Periodontitis. I. Relationship of Initial Occlusal Discrepancies to Initial Clinical Parameters *J Periodontol*. 2001; 72:485-494..
21. Harrel S.K.; Nunn M.E. The effect of occlusal discrepancies on periodontitis. II. Relationship of occlusal treatment to the progression of periodontal disease. *J Periodontol*. 2001; 72(4):495-505.
22. Palcanis KG. Effect of occlusal trauma on interstitial pressure in the periodontal ligament. *J Dent Res* 1973; 52(5):903-10.
23. 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; 22(10):772-9.
24. Glickman I. Role of occlusion in the etiology and treatment of periodontal disease. *J Dent Res* 1971; 50(2):199-204.
25. Jabôr, G.M.; Suchard, C.A.; Martins Filho, C.M.; Tames, D.R. 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.
26. Strobl, H, Moschen I, Emshoff I & Emshoff R. Effect of luxation type on pulpal blood flow measurements: a long-term follow-up of luxated permanent maxillary incisors. *Journal of Oral Rehabilitation* 2005;32:260–265

27. Pereira AL, de Mendonça MR, Sonoda CK, Cuoghi OA, Poi WR. Histological evaluation of experimentally induced subluxation in rat molars and its implications on the management of orthodontic treatment. *Dent Traumatol* 2010;26(1):37-42.
28. Sodeyama T, Maeda T, Takano Y, Hara K. Responses of periodontal nerve terminals to experimentally induced occlusal trauma in rat molars: an immunohistochemical study using PGP 9.5 antibody. *J Periodontal Res* 1996;31(4):235-48.
29. Kawamoto S, Nagaoka E. The effect of oestrogen deficiency on the alveolar bone resorption caused by traumatic occlusion. *J Oral Rehabil* 2000;27(7):587-94.
30. 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.
31. Wan HY, Sun HQ, Sun GX, Li X, Shang ZZ. The early phase response of rat alveolar bone to traumatic occlusion. *Arch Oral Biol* 2012;57(6):737-43.
32. Panzarini SR, Holland R, de Souza V, Poi WR, Sonoda CK, Pedrini D. Mineral trioxide aggregate as a root canal filling material in reimplanted teeth. Microscopic analysis in monkeys. *Dental Traumatol* 2007;23:265-72
33. Ritwik P, Massey C, Hagan J. Epidemiology and outcomes of dental trauma cases from an urban pediatric emergency department. *Dent Traumatol*. 2015 Apr;31(2):97-102.
34. 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.

35. Kahler B, Heithersay GS. An evidence-based appraisal of splinting luxated, avulsed and root-fractured teeth. *Dent Traumatol* 2008;241:2–10.
36. Lauridsen E, Hermann NV, Gerds TA, Ahrensburg SS, Kreiborg S, Andreasen JO. Combination injuries 2. The risk of pulp necrosis in permanent teeth with subluxation injuries and concomitant crown fractures. *Dent Traumatol* 2012; 28:371–8.
37. Trepe M. Clinical management of the avulsed tooth: present strategies and future directions. *Dent Traumatol*. 2002; 18: 1-11.
38. Andreasen JO, Andreasen FM. *Texto and atlas colorido de trauma dental*, 3rd edn. Porto Alegre: Artmed; 2001.
39. Tronstad L Root resorption - etiology, terminology and clinical manifestations. *EndodDentTraumatol*. 1988; 4:241-51.
40. 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 Jun;49(3):314-22.
41. Andreasen JO, Andreasen F, Andersson L. *Textbook and color atlas of traumatic injuries to the teeth*. 4th ed. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2007.
42. Yilmaz RS, Darling AI, Levers BGH. Experimental tooth ankylosis and horizontal tooth movement in the pig. *Arch Oral Biol*. 1981;26(1):41-7.
43. Mine AK, Kannob Z, Muramotob T, Kunimichi H. Some occlusal forces promote periodontal healing of transplanted teeth and prevent dento-alveolar ankylosis: an experimental study in rats. *Angle Orthod*. 2005;75(4):637-44.

44. Andreasen JO, Paulsen HU, Yu Z, Schwartz O. A long-term study of 370 autotransplanted premolars. Part III. Periodontal healing subsequent to transplantation. *Eur J Orthod.* 1990;12(1):25-37.
45. Andreasen JO, Andreasen FM, Skeie A, Hjørting-Hansen E, Schwartz O. Effect of treatment delay upon pulp and periodontal healing of traumatic dental injuries: a review article. *Dent Traumatol.* 2002;18(3):116-28.
46. Panzarini SR, Pedrini D, Poi WR, Sonoda CK, Brandini DA, Monteiro de Castro JC. Dental trauma involving root fracture and periodontal ligament injury: a 10-year retrospective study. *Braz Oral Res.* 2008;22(3):229-34.
47. Andreasen FM, Sewerin I, Mandel U, Andreasen JO. Radiographic assessment of simulated root resorption cavities. *Endod Dent Traumatol* 1987;3:21–7
48. Andersson, L., S. Lindskog , L. Blomlof , K. G. Hedstrom , and L. Hammarstrom . Effect of masticatory stimulation on dentoalveolar ankylosis after experimental tooth replantation. *Endod Dent Traumatol* 1985;1:13–16.
49. Andreasen, F. M. The effect of splinting upon periodontal healing after replantation of permanent incisors in monkeys. *Acta Odontol Scand* 1975;33:313–323.
50. Kindelan SA, Day PF, Kindelan JD, Spencer JR, Duggal MS. Dental trauma: an overview of its influence on the management of orthodontic treatment. Part 1. *J Orthod.* 2008;35(2):68-78.
51. Su M, Borke JL, Donahue HJ, Li Z, Warshawsky NM, Russell CM, Lewis JE. Expression of connexin 43 in rat mandibular bone and periodontal ligament (PDL) cells during experimental tooth movement. *J Dent Res.* 1997;76(7):1357-66.

52. Seeman E, Delmas PD. Bone quality-the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med* 2006;354:2250-61.
53. Taylor AF, Saunders MM, Shingle DL, Cimbala JM, Zhou Z, Donahue HJ. Mechanically stimulated osteocytes regulate osteoblastic activity via gap junctions. *Am J Physiol, Cell Physiol* 2007;292:C545–52.
54. Mimura H, Takaya T, Matsuda S, Nakano K, Muraoka R, Tomida M, Okafuji N, Fujii T, Kawakami T. Functional Role of HSP47 in the Periodontal Ligament Subjected to Occlusal Overload in Mice. *Int J Med Sci* 2016 Feb 20;13(4):248-54.
55. Yoshinaga Y, Ukai T, Abe Y, Hara Y. Expression of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand relates to inflammatory bone resorption, with or without occlusal trauma, in rats. *J Periodontal Res* 2007;42(5):402-9.
56. Schuback P, Vogel R, Deasy M. Occlusal trauma and inflammatory periodontal disease. *Ann Dent* 1976;35(4):69-74.
57. Fu JH, Yap AU. Occlusion and periodontal disease-where is the link? *Singapore Dent J* 2007;29(1):22-33.
58. Foster TD, Grundy MC. Occlusal changes from primary to permanent dentitions. *Br J Orthod* 1986;13:187–93.
59. Casamassino P, Christensen J, Fields HW. The transitional year: six to twelve years. In: Pinkham JR, Casamassino P, Fields HW, editors. *Pediatric dentistry: examination, diagnosis, and treatment planning*. 1st edn. Philadelphia: WB Saunders; 1988. p. 355–6.
60. Bergersen EO. A longitudinal study of anterior vertical overbite from eight to twenty years of age. *Angle Orthod* 1988;58:237–56.

61. Eismann D, Reichert M. Individual overbite behavior between the deciduous and permanent dentition. *Fortschr Kieferorthop* 1990;51:213–7.

Apêndice

APÊNDICE - Ilustração dos procedimentos experimentais

Equipe trabalhando

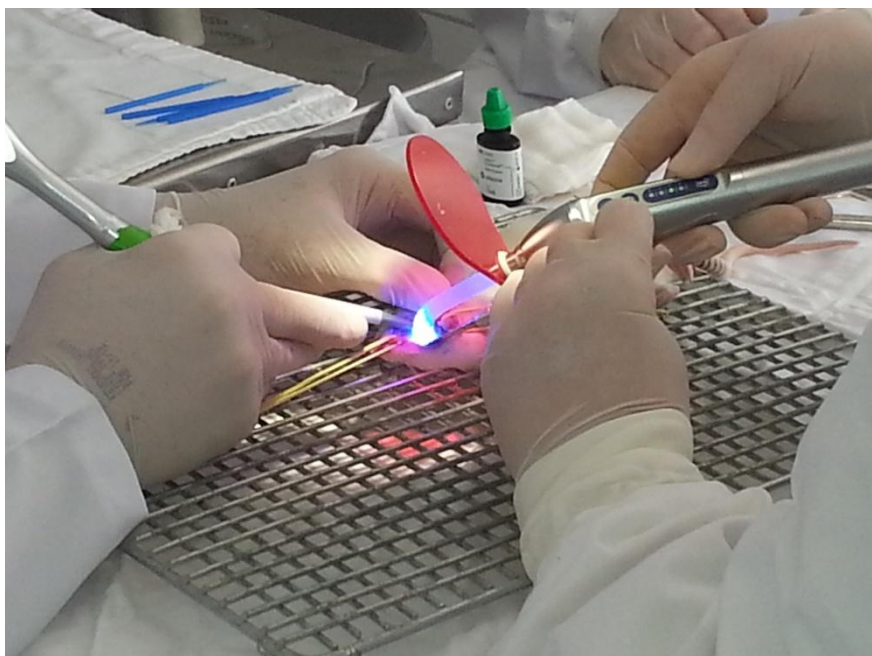


Fig. 02 – Equipe realizando o procedimento de restauração com resina composta no 1ºMSD do rato.

Indução da Oclusão traumática



Fig.03 – Restauração direta de resina composta finalizada, criando uma plataforma oclusal plana para indução da oclusão traumática.

Procedimento de indução da Subluxação

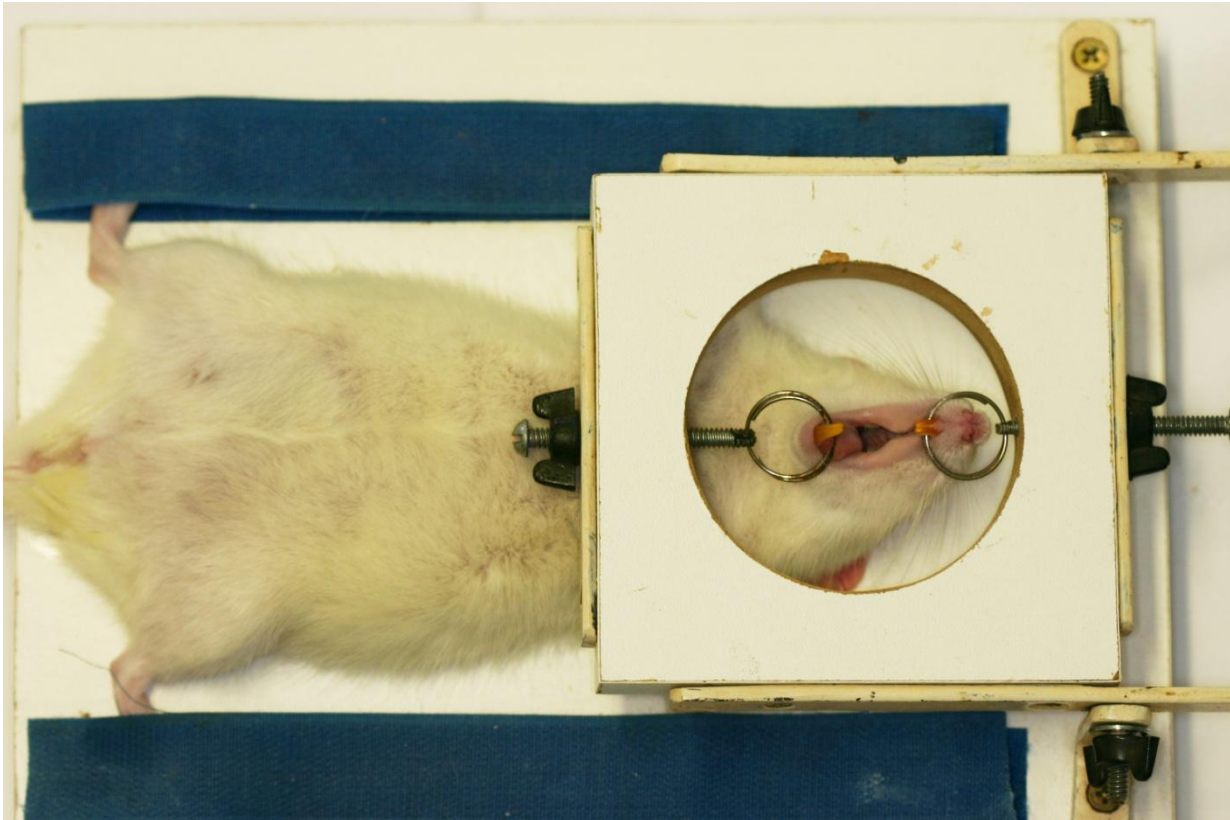


Fig.05A – Animal devidamente posicionado em uma mesa cirúrgica em decúbito dorsal com suas patas traseiras e dianteiras presas com um velcro (VELCRO®).

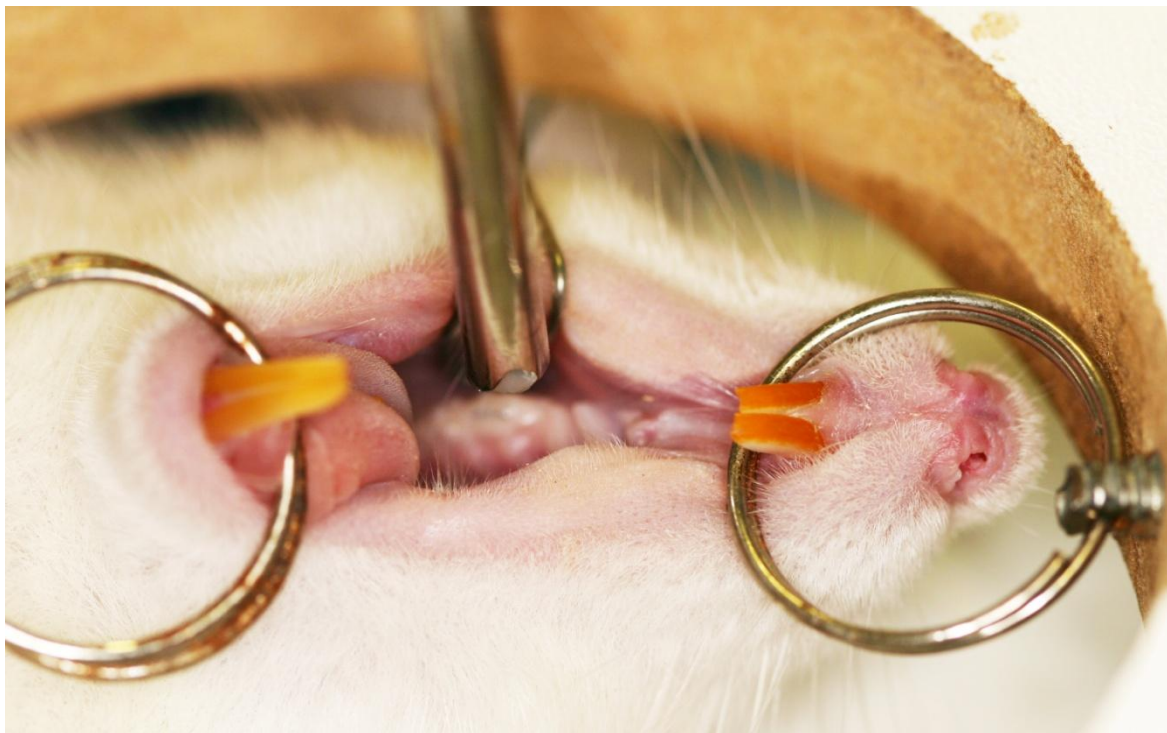


Fig.05B – Boca do animal aberta por anéis posicionados nos incisivos e extremidade arredondada do tensiômetro posicionado para aplicação de uma força aguda ocluso-gengival na superfície oclusal do 1ºMSD.

Anexos

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética no Uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Efeito da oclusão traumática no processo de reparo de dentes com subluxação"**, Processo FOA nº 2014-00795, sob responsabilidade de Daniela Atili Brandini de Weert apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 26 de junho de 2014.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 10 de Novembro de 2016.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 10 de Dezembro de 2016.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Effect of traumatic occlusion in the repair process of teeth with subluxation"**, Protocol FOA nº 2014-00795, under the supervision of Daniela Atili Brandini de Weert presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 26, 2014.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: November 10, 2016.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: December 10, 2016.

Prof. Dr. Edilson Ervolino
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

ANEXO B- Ilustração do material e método

Materiais usados para restauração do 1º molar superior do rato



A
Fig.01 A – ácido fosfórico 37% para esmalte e dentina (FGM, Joinville, Santa Catarina, Brasil)



B
Fig.01 B – adesivo fotopolimerizável Scotchbond Multi-Purpose (3M ESPE, Sant Paul, Minnesota, EUA)



C
Fig.01 C – resina composta fotopolimerizável Estelite (Tokuyama Dental Corp, Osaka, Japão)



D
Fig.01 D - fio de aço de 0,20 milímetros (0,008") (Morelli, Sorocaba, São Paulo, Brasil)

Materiais usados para Indução da subluxação

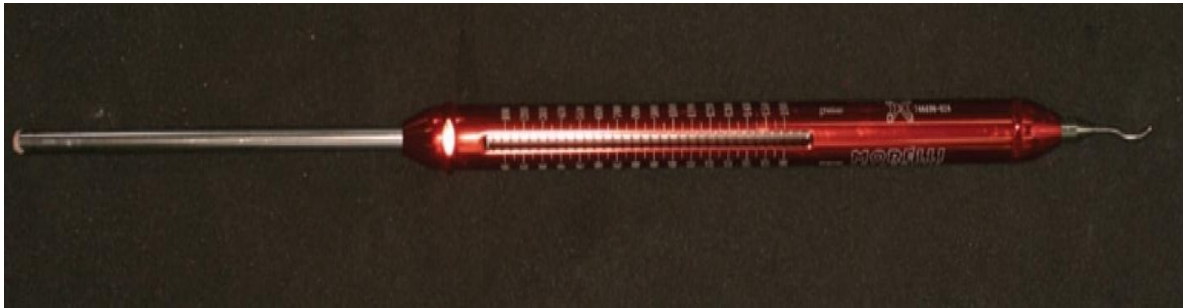


Fig.02A – tensiômetro (Morelli , Sorocaba , SP, Brasil - código 72.02.006)



Fig.02B Uma das extremidades do tensiômetro foi modelada para uma forma redonda com resina acrílica (Orto -Class; Clássico, São Paulo, SP, Brasil)

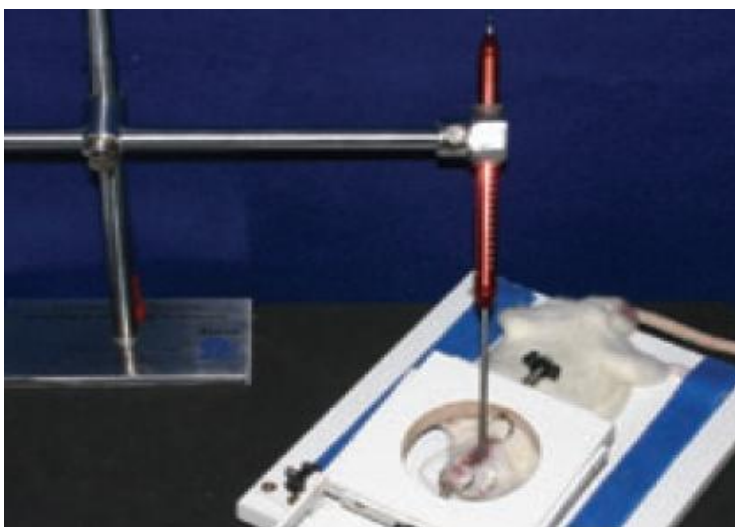


Fig.02C suporte com eixos ajustáveis de aço galvanizado com o tensiômetro e mesa com o rato já posicionado e preso adequadamente.

ANEXO C - Normas do periódico “Dental Traumatology”

Author Guidelines

Content of Author Guidelines: [1. General](#), [2. Ethical Guidelines](#), [3. Submission of Manuscripts](#), [4. Manuscript Types Accepted](#), [5. Manuscript Format and Structure](#), [6. After Acceptance](#)

Useful Websites: [Submission Site](#), [Articles published in Dental Traumatology](#), [Author Services](#), [Wiley-Blackwell's Ethical Guidelines](#), [Guidelines for Figures](#)

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 (version, 2008 <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>) 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 Transfer Agreement

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the [Copyright FAQs](#).

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on [Wiley Author Services](#) and

visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please

visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

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 Wiley-Blackwell 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 Wiley-Blackwell. 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 completed online before any manuscript can be published upon receiving notice of manuscript acceptance.

Kuthsiyya Peer Mohamed
 Production Editor
 John Wiley & Sons Singapore Pte Ltd
 1 Fusionopolis Walk,
 #07-01 Solaris South Tower,
 Singapore 138628
 Email: edt@wiley.com
 Fax: +65 6643 8599

2.9 Online Open

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive.

For the full list of terms and conditions, see http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms.

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

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.

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 (Family names should be underlined) 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 250 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 (version, 2008<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>) 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