



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

CAIO VINÍCIUS LOURENÇO DEBORTOLI

**Influência da oclusão traumática no processo de
reparo do periodonto em dentes submetidos a
luxação extrusiva**

Araçatuba

2018

CAIO VINÍCIUS LOURENÇO DEBORTOLI

**Influência da oclusão traumática no processo de
reparo do periodonto em dentes submetidos a
luxação extrusiva**

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. Adj. Celso Koogi Sonoda

Coorientadora: Prof. Ass. Dra. Daniela Atili Brandini

Araçatuba

2018

Catálogo-na-Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

D287i	<p>Debortoli, Caio Vinícius Lourenço. Influência da oclusão traumática no processo de reparo do periodonto em dentes submetidos a luxação extrusiva / Caio Vinícius Lourenço Debortoli. - Araçatuba, 2018 66 f. : il.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba Orientador: Prof. Celso Koogi Sonoda Coorientadora: Profa. Daniela Atili Brandini</p> <p>1. Traumatismos dentários 2. Oclusão dentária traumática 3. Periodonto 4. Ligamento periodontal I. Título</p> <p>Black D2 CDD 617.6</p>
-------	--

Ana Claudia M. Grieger Manzatti – CRB-8/6315

DADOS CURRICULARES

Caio Vinícius Lourenço Debortoli

Nascimento: 23/01/1991 – Birigui SP

Filiação: Celso Debortoli

Meire Regina Lourenço Debortoli

2011- 2015 **Graduação em Odontologia**

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

2016- Atual **Mestrado em Odontologia- Área de Concentração:**

Clínica Integrada

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
Filho, UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

Dedicatória

A Jesus Cristo, meu salvador, refugio, razão da minha existência e por quem eu vivo todos os meus dias. Me deu forças e mostrou que na minha fraqueza, Ele se torna forte e me livra das aflições. Amor Incondicional que eu posso sentir todos os dias ao abrir os olhos pela manhã. A Ele todo o meu ser, todo fruto das minhas mãos e eterna gratidão.

Aos meus pais, Celso e Meire,

Que são as minhas maiores referencias nessa terra, exemplos de garra, perseverança, fé, amor, bondade e honestidade. Estiveram comigo em todos os momentos da minha vida, me dando suporte e me ajudando a ser cada vez melhor e mais forte. Devo tudo o que

sou a eles.

Amo vocês!

A minha irmã Heloisa,

Pelo apoio incondicional, amor e parceria, que me incentivou durante todo esse trabalho, por ser esse exemplo de garra e perseverança.

Aos meus amigos

Que me apoiaram em todo momento e estiveram comigo me ajudando na caminhada e me incentivando para a realização dessa etapa

Agradecimentos Especiais

À minha co-orientadora,

Prof.^a Dra. Daniela Atili Brandini que com persistência , carinho, dedicação e paciência tornou possível a realização desse trabalho.

Um exemplo tanto como profissional quanto como pessoa. Sua dedicação pelos alunos e amor a profissão me inspira. Sou extremamente grato por ter trabalhado contigo todos esses anos, por todos os ensinamentos, palavras de incentivo e por acreditar sempre que eu era capaz. Muito obrigado!

Ao meu orientador,

Prof. Dr. Celso Koogi Sonoda que muito me ensinou, contribuindo para o meu desenvolvimento científico e intelectual. Profissional exemplar e pesquisador brilhante! Muito obrigado pela oportunidade, ensinamentos ao longo desse trabalho.

*Aos professores da Disciplina de **Clínica Integrada**, Wilson Poi, Sônia Panzarini, Denise Pedrini e Eloa Luvizuto pelos conhecimentos e ensinamentos ao longo da minha caminhada como profissional. São todos exemplos de profissionais que eu levarei durante a minha carreira. Muito obrigado!*

Ao departamento de Ciências Básicas, principalmente em nome do Prof. Cláudio Casatti , pelo suporte e ajuda para a realização desse projeto.

As alunos de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba: Marina Fuzette Amaral e Gestter Tessarin. E alunos de graduação Sara Felipe Akabane e Cintia Vanessa Laves do Nascimento. Pessoas que foram essenciais para o cumprimento dessa etapa e que dividiram muitas experiências e aprendizados.

Obrigado Marina Fuzette Amaral, Sara Felipe Akabane e Cintia Vanessa Laves do Nascimento pela amizade e força na realização dessa etapa. Vocês são alunos inspiradores e companheiros de extrema competência e comprometimento.

A minha família (Mãe, pai, irmã, amigos), pelo incentivo, pelo alicerce, por dar todas as condições para que eu pudesse desempenhar o meu melhor durante o trabalho. Sou extremamente grato pela paciência nos momentos difíceis e por me incentivar no desânimo e pelo amor desprendido.

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.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba-UNESP, nas pessoas da Diretor Prof. Dr. Wilson Roberto Poi e do Vice-Diretor Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho 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 Lilian 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 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.

"Tenha em mente que tudo que você aprende na escola é trabalho de muitas gerações. Tudo isso é posto em sua mão como sua herança para que você receba-a, honre-a, acrescente a ela e, um dia, fielmente, deposite-a nas mãos de seus filhos".

Albert Einstein

Debortoli CVL. **Influência da oclusão traumática no processo de reparo do periodonto em dentes submetidos a luxação extrusiva** [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2018.

RESUMO

O tratamento luxação extrusiva visa o reparo das estruturas de suporte do periodonto com o dente em posição original, contudo pode ser prejudicado por alguns fatores como a oclusão traumática. Este estudo avaliou a influência da oclusão traumática no processo de reparo dos tecidos de suporte periodontais de dentes que sofreram luxação extrusiva. Sessenta ratos Wistar foram divididos em três grupos: Grupo Controle (n=20), Grupo Luxação Extrusiva (n=20) e Grupo Luxação Extrusiva e Oclusão Traumática (n=20), nos períodos experimentais de 7 e 30 dias. O dente de estudo foi o primeiro molar inferior direito. A luxação extrusiva foi simulada pela indução de forças no sentido axial até o seu deslocamento e reposição do dente por pressão digital. A oclusão traumática foi induzida por restauração de resina composta e fio metálico na superfície oclusal, criando uma plataforma plana. Cortes histológicos longitudinais foram corados com hematoxilina e eosina, Picrosirius red e técnica imunoistoquímica para detecção da TRAcP. Foi avaliada a reabsorção óssea e dentária, área de fibras colágenas, matriz extracelular não fibrilar e vasos sanguíneos, número de perfil nuclear e células TRAcP, organização do ligamento periodontal, extensão e intensidade do processo inflamatório. O teste de Kruskal-Wallis e post hoc de Dunn foram utilizados para a comparação entre os grupos ($\alpha=0,05$). Dentre as diferenças significativas observou-se: aos 7 dias um aumento de células TRAcP e uma diminuição da área óssea do septo inter-radicular em L e LOT, bem como um aumento da reabsorção óssea marginal no grupo LOT quando comparado ao grupo controle; aos 30 dias, as fibras colágenas tipo I tiveram um aumento no grupo L, bem como, aumento da reabsorção óssea marginal nos grupos experimentais. No modelo

experimental estudado, a oclusão traumática gerou prejuízo significativo na recuperação nas estruturas de suporte do dente submetido a luxação extrusiva a curto prazo.

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

Debortoli CVL. **Influence of traumatic occlusion on the periodontal repair process in teeth submitted to extrusive luxation** [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2018.

ABSTRACT

The extrusive luxation treatment aims to repair the structures of the periodontium with the tooth in original position, however it can be impaired by some factors such as traumatic occlusion. This study aims to evaluate the influence of traumatic occlusion on the repairing process of the periodontal tissues of the tooth submitted to extruded luxation. Sixty Wistar rats was divided into three groups: Control group (n=20), Extrusive luxation group (n=20) and Extrusive luxation and Traumatic Occlusion group(=20), in the experimental periods of 7 and 30 days. The experimental tooth was the first lower right molar. The extrusive luxation was simulated by the induction of forces in the axial direction until its displacement and replacement of the tooth by digital pressure. Traumatic occlusion was induced by restoration of composite resin and metallic wire on the occlusal surface, creating a flat platform. Longitudinal histological sections were stained with hematoxylin and eosin, Picrosirius red and immunohistochemical technique for the detection of TRAcP. Bone and dental resorption, area of collagen fibers, extracellular non-fibrillar matrix and blood vessels, number of nuclear profile and TRAcP cells, periodontal ligament organization, extent and intensity of the inflammatory process were evaluated. The Kruskal-Wallis and post hoc Dunn tests were used to compare the groups ($\alpha = 0.05$). Among the significant differences were observed at 7 days an increase of TRAcP cells and a decrease of the inter-radicular septum bone area in the L and LTO groups, as well as an increase in the marginal bone resorption in the LTO group when compared to the control group; at 30 days, type I collagen fibers had an increase in the L group, as well as increased marginal bone resorption in the experimental groups. In the experimental model studied, traumatic

occlusion generate a significant impairment in the recovery of the periodontal support structures of the tooth submitted to extrusive luxation in a short period.

Keywords: Tooth Injuries. Traumatic Dental Occlusion. Periodontium. Periodontal Ligament.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Método de indução da oclusão traumática no 1ºMID. 23
- Figura 2 Regiões de análise no 1ºMID submetidas a análise histomorfométrica e imunoistoquímica. 27
- Figura 3 Cortes longitudinais do ligamento periodontal corados em Picrosirius Red em microscopia de luz polarizada. A imagem D mostra um aumento significativo de fibras colágenas do tipo I (vermelhas amareladas) no grupo L no período de 30 dias. 34
- Figura 4 Cortes longitudinais do septo inter-radicular do 1ºMID submetido a técnica imunoistoquímica de detecção de TRAcP em microscopia de luz. As imagens C e E mostram o aumento significativo de células TRAcP nos grupos experimentais em 7 dias. As setas indicam as células imunomarcadas. 35
- Figura 5 Cortes longitudinais do ligamento periodontal do 1ºMID submetido a técnica imunoistoquímica de detecção de TRAcP em microscopia de luz. A imagem E mostra o aumento significativo das células TRAcP no grupo LOT em 7 dias. As setas indicam as células imunomarcadas. 36
- Figura 6 Cortes longitudinais do septo inter-radicular do 1ºMID corados em HE sob microscopia de luz. As imagens C e E mostram uma diminuição significativa da área óssea dos grupos experimentais em 7 dias, sendo o 37

grupo LOT (imagem E) o mais afetado.

Figura 7 Cortes longitudinais do ligamento periodontal 1ºMID 40 corados em HE sob microscopia de luz. Os grupos experimentais mostram presença de reabsorções radiculares rasas e pouco extensas. O grupo LOT apresentou casos de recuperação do cimento em 30 dias (F).

Figura 8 Cortes longitudinais do ligamento periodontal do 44 1ºMID corados em HE sob microscopia de luz. A imagem E mostra um aumento significativo nas áreas de reabsorção ossea marginal no grupo LOT em 7 dias. O aumento significativo de reabsorção óssea marginal nos grupos experimentais em 30 dias estão representados pelas imagens D e F .

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Analise estatística dos eventos histomorfométricos 33
associado ao ligamento periodontal e o osso alveolar
nos grupos experimentais por Kruskal-Wallis com
post-hoc test de Dunn com 5% nível de significância.
Todos os dados estão expressados em média.
- Tabela 2 Distribuição de escores e análise estatística de 38
detalhes histomorfométricos na raiz dental por
Kruskal-Wallis com post-hoc test de Dunn com 5%
de nível de significância. Os dados estão
apresentados em números de eventos.
- Tabela 3 Distribuição de escores e análise estatística de 41
detalhes histomorfométricos no ligamento periodontal
por Kruskal-Wallis com post-hoc test de Dunn com
5% de nível de significância. Os dados estão
apresentados em números de eventos.
- Tabela 4 Distribuição de escores e análise estatística de 43
detalhes histomorfométricos no osso alveolar por
Kruskal-Wallis com post-hoc test de Dunn com 5%
de nível de significância. Os dados estão
apresentados em números de eventos.

LISTA DE ABREVIATURAS

μm - micrometro.

1º MID – Primeiro molar inferior direito.

1º MSD – Primeiro molar superior direito.

C- Controle.

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético.

H.E. – Técnica de coloração das lâminas com hematoxilina e eosina.

I.M.-Intra Muscular

L – Luxação Extrusiva.

LOT – Luxação Extrusiva + Oclusão Traumática.

LP – Ligamento Periodontal.

M – molar.

mg/Kg – Miligramas por quilo.

ml – Mililitros.

mm - Milímetro, equivalente a milésima parte do metro.

°C - Grau Celsius.

PBS- Tampão fosfato de sódio.

PBST – Tampão fosfato de sódio adicionado de Triton

pH- potencial Hidrogeniônico.

PR – Técnica de coloração das lâminas com Picrosirius Red

TRAcP – Fosfatase ácida tartarato resistente

U.I/ml - Unidades Internacionais por mililitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	PROPOSIÇÃO	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1	Animais envolvidos e procedimentos realizados.	22
3.2	Grupos Experimentais	24
3.3	Perfusão transcardíaca e processamento histológico	24
3.4	Processamento imunoistoquímico e detecção de TRAcP.	25
3.5	Processamento para coloração Picrosirius Red para colágeno	26
3.6	Análise dos resultados	27
3.6.1	Análise histológica quantitativa.	27
3.6.2	Análise morfométrica das fibras colágenas, vasos sanguíneos, matriz extracelular e número de perfis nucleares do ligamento periodontal	28
3.6.3	Análise quantitativa da espessura do ligamento periodontal.	28
3.6.4	Análise quantitativa de reabsorção radicular, organização do ligamento periodontal, reabsorção óssea e anquilose.	29
3.6.5	Análise Estatística	30

4	RESULTADOS	31
4.1	Teste de correlação não paramétrica	32
5	DISCUSSÃO	45
6	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50
	ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética no Uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba	54
	ANEXO B - Normas do periódico "Dental Traumatology"	55

1 INTRODUÇÃO

Além da cárie e da doença periodontal, o traumatismo dentário tem se constituído em uma das principais causas de perda de dentes. Entre os tipos existentes, o trauma de luxação desperta especial atenção por afetar estruturas como ligamento periodontal, cemento e osso alveolar. Fatores como a direção do impacto, resiliência e superfície dos objetos envolvidos, além da energia envolvida no impacto, irão determinar a extensão dos danos provocados à região envolvida além de caracterizar o tipo de trauma.¹ Traumas como a luxação intrusiva e a avulsão dentária geralmente resultam em danos mais severos à estrutura radicular. No entanto, os traumas com menor severidade ao periodonto como a luxação extrusiva também desperta preocupação pois também pode resultar em sequelas ao dente envolvido. Em alguns casos são negligenciados pelo paciente e a falta de tratamento pode resultar em uma deficiência no reparo das estruturas lesadas.

A luxação extrusiva é definida como o deslocamento parcial do dente para fora do seu alvéolo,² caracterizando-se uma injúria aos tecidos de suporte do dente onde há o rompimento parcial ou total das fibras do ligamento periodontal (LP), tendo como consequência o deslocamento axial do dente, podendo causar rompimento ou alongamento do feixe neurovascular apical.^{2,3} Clinicamente o dente apresenta mobilidade excessiva, aspecto alongado, sangramento proveniente do ligamento periodontal e responde negativamente aos testes de sensibilidade na maioria dos casos. Radiograficamente, há um aumento do espaço do ligamento periodontal na região apical.^{2,4-6} Histologicamente, nota-se a aparência incomum do LP devido ao trauma; apresentando alongamento, compressão ou rompimento das fibras, além de alguns achados como áreas de edema, hemorragia, picnose e degeneração das células do LP.^{7,8} O tratamento de escolha para a luxação extrusiva consiste na reposição do dente, reinserindo-o dentro do alvéolo, e o uso de uma contenção flexível durante duas semanas.^{2,4}

O objetivo do tratamento é a reparação e reorganização do ligamento periodontal, bem como a recuperação ou manutenção do suprimento vascular e nervoso da polpa.³ Porém, por se tratar de um tipo de traumatismo que danifica as estruturas periodontais, algumas complicações podem surgir no período de acompanhamento posterior ao tratamento.⁹ Em dentes permanentes, com completo desenvolvimento radicular e que sofreram luxação extrusiva, existem riscos de surgir complicações como reabsorção inflamatória (5,1%), reabsorção de reparo (15,6%) e perda óssea marginal (17,5%). Em dentes permanentes com desenvolvimento radicular incompleto, as chances de reabsorção inflamatória são menores (2,4%).³ O prognóstico e as chances de existirem complicações estão relacionados ao estágio de formação das raízes, sendo muito maiores quando há a formação completa das raízes.^{2,10}

Existem outras condições de trauma dentário, especialmente relacionados a hábitos parafuncionais da mastigação, que também podem resultar em danos ao ligamento periodontal. Uma dessas condições, a oclusão traumática tem sido observada com relativa frequência na população atualmente. A oclusão traumática tem como resultado principal o trauma oclusal primário que é descrito como uma injúria que acomete as estruturas de suporte dentais devido ao excesso de forças oclusais.¹¹ Os efeitos da oclusão traumática sobre o LP são a compressão gradativa do ligamento, desorganização do arranjo de fibras do LP, diminuição do número de vasos sanguíneos e aumento no número de osteoclastos.

O reestabelecimento do aporte neurovascular para a manutenção da vitalidade pulpar e a reorganização das fibras do ligamento periodontal são cruciais para que haja sucesso no tratamento de um dente que sofreu luxação.^{2,3} Sendo assim, a observação de fatores como a oclusão traumática, se torna importante para determinar quais interferências podem ocorrer no processo de reparo do ligamento periodontal e no sucesso do tratamento preconizado.

2 PROPOSIÇÃO

Este estudo avaliou o processo de reparo do periodonto em dentes de rato que sofreram luxação extrusiva e a influência da oclusão traumática no processo de reparo por meio de análises histomorfométricas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS.

3.1 Animais envolvidos e procedimentos realizados.

Os materiais e os métodos envolvidos no experimento foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (UNESP) (Protocolo nº 2014-00432).

Foram utilizados 60 ratos Wistar, machos com 12 semanas de vida, obtidos e mantidos no Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (UNESP). Os animais foram acomodados em gaiolas com cinco animais cada, à uma temperatura ambiente de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, $50 \pm 10\%$ de umidade relativa do ar e ciclos de claro/escuro de 12/12 horas. Receberam água *ad libitum* e ração granulada durante todo o experimento.

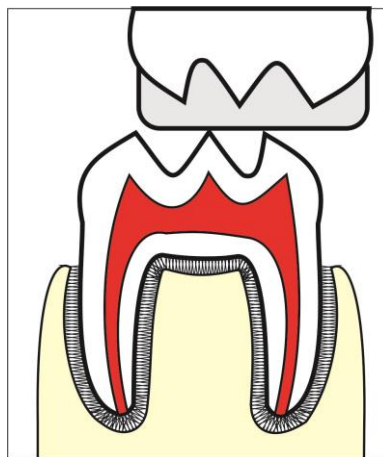
Para execução dos procedimentos experimentais os animais receberam como relaxante muscular a xilazina (10mg/kg, Coopazine; Coopers, São Paulo, Brasil) e para a anestesia foi utilizado o cloridrato de quetamina (80 mg/kg, Vetanarcol; Laboratórios König, Buenos Aires, Argentina); ambas as drogas foram administradas por via intramuscular (I.M.).

Após serem anestesiados, os animais são posicionados na mesa operatória em decúbito dorsal, tendo os membros caudais e craniais imobilizadas de maneira que a cabeça do animal fique estável e a boca aberta por meio de anéis posicionados nos incisivos superiores e inferiores.

O método utilizado para induzir a oclusão traumática é descrito na literatura e consiste em uma elevação da superfície oclusal do primeiro molar superior direito, utilizando um preenchimento direto com resina composta, criando um platô oclusal na altura das cúspides dos dentes e

de superfície plana.¹²⁻¹⁵ Foram feitas retenções no primeiro molar superior direito (1º MSD) com brocas do tipo Carbide ¼ FG (Beavers Dental, Sybron, Morrisburg, ON, Canada) acoplada em alta rotação sob irrigação constante. A superfície oclusal foi condicionada com ácido fosfórico a 37% para esmalte e dentina (FGM, Joinville, São Paulo, Brazil) durante um minuto. Foi realizada lavagem com água corrente, durante um minuto e secagem com o auxílio de seringa tríplice. Com o auxílio de microbrush (Microbrush Int., Grafton, MA, EUA), foi aplicada uma camada de adesivo fotopolimerizável (Scotchbond Multipurpose; 3M ESPE, Saint Paul, MN, EUA) e fotopolimerizada por 20 segundos. Por fim, a aplicação de uma porção de resina composta fotopolimerizável (Estelite, Tokuyama Dental, Osaka, Japan) para elevar a superfície oclusal. Para padronização da espessura deste artefato, foi incorporado um pedaço de fio de aço 0,20 mm (0,008") (Morelli, Sorocaba, São Paulo, Brasil) antes de sua polimerização por um minuto.

Figura 1 – Método de indução da oclusão traumática no 1ºMID.



FONTE: Elaborado pelo Autor.

Para um melhor controle de umidade, contaminação e prevenção de traumas adicionais no dente luxado pelos equipamentos utilizados durante a realização do platô oclusal, o método da oclusão traumática foi realizado anteriormente a luxação extrusiva nos animais do grupo LOT. Para promover a luxação extrusiva, ainda com o animal em posição, um

instrumento adaptado, posicionado na porção distal da coroa no primeiro molar inferior direito (1º MID) promoveu a luxação do dente. Após a constatação da luxação do dente, foi realizado o reposicionamento imediato com uma leve pressão digital, afim de devolver o dente em sua posição original no alvéolo com o cuidado de não promover traumas adicionais ao periodonto e contaminação por saliva.

3.2 Grupos Experimentais:

Os animais foram divididos em três grupos de 20 para cada procedimento experimental. A eutanásia foi realizada após períodos de 7 e 30 dias (10 animais por período).

- Grupo Controle (C) (n=20): Animais que não foram submetidos a nenhum procedimento.

- Grupo Luxação Extrusiva (L) (n=20): Animais submetidos à luxação extrusiva com reposicionamento imediato, sem alteração de oclusão.

- Grupo Luxação Extrusiva e Oclusão Traumática (LOT) (n=20): Animais submetidos a luxação extrusiva com reposicionamento imediato e oclusão traumática.

3.3 Perfusão transcardíaca e processamento histológico.

A eutanásia ocorreu por meio de perfusão transcardíaca. Para isso os animais foram devidamente anestesiados e colocados em decúbito dorsal. Uma vez acessado o coração foi administrada heparina (0,1ml/5000 U.I/ml) por via intraventricular (ventrículo esquerdo). Após 10 segundos, a cânula da bomba perfusora foi colocada na artéria aorta para a perfusão com 100 ml de solução salina a 0,9%, e posteriormente 300 ml solução de paraformaldeído 4% (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) em tampão de fosfato de sódio (PBS) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) a 0,1M, pH 7,4 a 4°C. As mandíbulas foram

imediatamente dissecadas e colocadas em solução fixadora por 24 horas. A descalcificação das mandíbulas foi realizada por meio EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético) a 10% (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) em PBS, por vinte dias e lavadas em PBS durante todo o processo.

As peças anatômicas dissecadas, após descalcificação, passaram por desidratação em soluções de álcoois em concentrações crescentes, diafanizadas em soluções de xilol, com, e seguidamente impregnadas em parafina de baixa fusão (56-58 °C) com três trocas de parafina, de uma hora cada. Os cortes foram realizados no sentido longitudinal, com o cuidado de abranger a raiz mesial e distal do primeiro molar ao mesmo tempo, com 4 µm de espessura e foram colocados em banho-maria (40-50°C) e recolhidos em lâminas silanizadas ou revestidas de poli-L-lisina, sendo três cortes por lâmina com diferença de 40 µm entre eles. Os cortes recolhidos em lâminas silanizadas foram utilizados para o processamento imunohistoquímico e detecção de TRAcP (Fosfatase ácida tartarato resistente). Já os cortes recolhidos em lâminas revestidas de poli-L-lisina foram utilizadas para a coloração no método do Picrosirius Red (PR) e Hematoxilina-eosina (HE).

3.4 Processamento imunohistoquímico e detecção de TRAcP.

Para o processo imunohistoquímico, os cortes foram submetidos a técnica da imunoperoxidase indireta, e seguiu os seguintes passos: a) desparafinização dos cortes histológicos em três banhos de xilol, respectivamente 5, 10 e 15 minutos cada; b) hidratação em cadeias decrescentes de álcoois, partindo do álcool absoluto, seguido por álcoois 90%, 70%, 50% e lavagem em tampão fosfato (PBS) 0,1 M, pH 7,4; c) recuperação antigênica dos sítios imunogênicos pela imersão dos cortes histológicos em tampão citrato (pH 6,0) em câmara pressurizada (95°C por 10 minutos); lavagem dos cortes em PBS; d) bloqueio da peroxidase endógena pela imersão das lâminas histológicas em PBS acrescido de 3%

de peróxido de hidrogênio, e) 3 lavagens dos cortes histológicos em PBS; f) bloqueio da biotina endógena pela incubação dos cortes histológicos em PBS acrescido de 0,03% de Triton (PBST; Sigma-Aldrich, MO, EUA) com 5% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo, Brasil) durante 1 hora; g) lavagem dos cortes em PBS, h) incubação com soro de cabra normal a 3% durante 60 minutos; i) incubação em anticorpo primário anti TRAcP (1 : 100, SC-30833, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) diluído em PBST acrescido de 3% de soro normal de cabra *overnight*; j) lavagem dos cortes histológicos em PBS; k) incubação em solução de anticorpo secundário biotilado durante 90 minutos; l) lavagens dos cortes em PBS; m) incubação dos cortes histológicos em estreptavidina durante 60 minutos, n) lavagem dos cortes em PBS. A revelação foi realizada utilizando como cromógeno 3,3' diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich, MO, EUA) sob controle visual em microscópio de luz. Finalmente os cortes foram corados com hematoxilina de Harris, desidratados, respectivamente, em temperatura ambiente e séries crescentes de alcoóis, diafanizados em xilol e protegidos por lamínula de vidro e meio de montagem (Entellan, Merckmillipore, HE, Alemanha).

3.5 Processamento para coloração Picrosirius Red para colágeno.

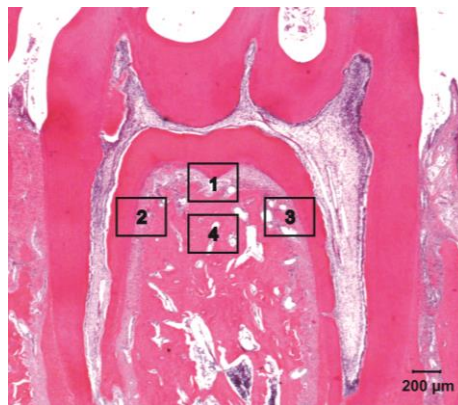
Os cortes em parafina foram colocados em solução de xilol para a desparafinação, e em seguida em solução de álcool em concentrações decrescentes até água. Durante meia hora, as lâminas foram coradas por Picrosirius Red.

3.6 Análise dos resultados.

3.6.1 Análise histológica quantitativa.

A análise histológica foi realizada em um microscópio óptico comum (Leica – Aristoplan, Alemanha) com uma câmera digital acoplada AxioCam MRc (AxioCam Mrc—Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha). As imagens referentes ao Picrosirius red foram obtidas em microscópio de luz polarizada (DM4000B; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Os campos visuais das regiões analisadas de cada corte em 400x foram coletadas com o software Axiovision Rel 4.0 (Carl Zeiss, GmbH, Alemanha). Foram considerados os terços cervical das raízes distal e mesial, e a região de furca do 1ºMID (Figura 2).

Figura 2 - Regiões de análise no 1ºMID submetidas a análise histomorfométrica e imunoistoquímica.



1-Região de furca do LP; 2-Região cervical LP da raiz distal; 3-Região cervical do LP da raiz mesial; 4-Região de septo inter-radicular.

FONTE: Elaborado pelo Autor

Os cortes corados com hematoxilina e eosina foram utilizados na avaliação das áreas de vasos sanguíneos, matriz extracelular não fibrilar, reabsorção radicular e óssea, largura do ligamento periodontal e anquilose. Já os cortes submetidos ao método Picrosirius red foram

utilizados para a análise do percentual de fibras colágenas do tipo I e III. As células clásticas foram contabilizadas nos cortes submetidos à detecção de TRAcP.

Na análise quantitativa, foram consideradas as porcentagens das áreas de fibras colágenas tipo I e III, matriz extracelular não fibrilar e vasos sanguíneos, além da largura do ligamento periodontal, número de perfis nucleares no ligamento periodontal, reabsorção do osso do septo inter-radicular e o número de células clásticas. A quantificação da organização do ligamento periodontal, processo inflamatório, reabsorção radicular, reabsorção óssea marginal e anquilose foram feitas por meio de escores.

3.6.2 Análise morfométrica das fibras colágenas, vasos sanguíneos, matriz extracelular e número de perfis nucleares do ligamento periodontal.

Para a análise morfométrica das áreas ocupadas por vasos sanguíneos e matriz extracelular não fibrilar, foi utilizado o software ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, Rockville, Maryland, EUA). As áreas a serem mensuradas foram delimitadas por meio de contraste e obtidas porcentagens em relação à área total. Os perfis nucleares foram contados com o auxílio da ferramenta "multi-point" do próprio programa. As fibras colágenas foram quantificadas pelo programa QWin (Leica QWin V3; Leica Microsystems), selecionando quanto a coloração, sendo que as vermelhas amareladas são colágeno tipo I e as verdes amareladas, colágeno do tipo III.¹⁶

3.6.3 Análise quantitativa da espessura do ligamento periodontal.

A espessura do ligamento periodontal foi obtida por meio das médias das regiões de escolha do 1ºMID com o auxílio do programa ImageJ (National Institutes of Health, EUA).

3.6.4 Análise quantitativa de reabsorção radicular, organização do ligamento periodontal, reabsorção óssea e anquilose.

Para quantificação desses dados foram atribuídos escores de 1 a 4 aos diferentes eventos, em ordem crescente, sendo 1 o melhor resultado e 4 o pior.¹⁷

A. Raiz do dente.

A.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);

A.2. Extensão da reabsorção radicular. (1. Ausência de reabsorção, 2. Extensão média de 1 a 1000 micrômetros, 3. Extensão média de 1001 a 5000 micrômetros, 4. Extensão média maior que 5001 micrômetros);

A.3. Profundidade de reabsorção radicular. (1. Ausência de reabsorção, 2. Profundidade média de 1 a 100 micrômetros, 3. Profundidade média de 101 a 200 micrômetros, 4. Profundidade média maior que 201 micrômetros).

A.4. Reparo nas áreas de reabsorção radicular. (1. Ausência de reabsorção ou deposição cemento neoformado em toda extensão das áreas reabsorvidas, 2. Deposição cemento neoformado em metade ou mais da extensão das áreas reabsorvidas, 3. Deposição cemento neoformado em menos da metade das áreas reabsorvidas, 4. Ausência de deposição de cemento neoformado junto às áreas reabsorvidas).

B. Tecido ósseo.

B.1. Áreas de reabsorção ativa e inativa (1. Ausência de área de reabsorção, 2. Presença de área de reabsorção inativa - ausência de células clásticas, 3. Presença de pequenas áreas de reabsorção ativa, 4. Presença de extensas áreas de reabsorção ativa).

B.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).

C. Ligamento Periodontal.

C.1. Organização do ligamento periodontal. (1. Fibras periodontais inseridas no osso e cimento em toda a extensão do ligamento, 2. Fibras periodontais inseridas no osso e cimento em dois terços da extensão do ligamento, 3. Fibras periodontais inseridas no osso e cimento em um terço da extensão do ligamento, 4. Ausência de fibras periodontais com inserção em osso e cimento).

C.2.

Intensidade do processo inflamatório agudo e crônico. (1. Ausência ou presença ocasional de células inflamatórias, 2. Pequeno número de células inflamatórias - até 10 células por campo, 3. Moderado número de células inflamatórias - de 11 a 50 células por campo, 4. Grande número de células inflamatórias - acima de 50 células inflamatórias por campo). C.3. Extensão do processo inflamatório agudo e crônico. (1. Ausência ou presença ocasional de células inflamatórias, 2. Processo inflamatório presente apenas no ligamento periodontal apical ou coronário ou pequena área lateral, 3. Processo inflamatório atingindo mais que a metade do ligamento periodontal lateral da raiz do dente, 4. Processo inflamatório em todo ligamento periodontal).

3.6.5 Análise Estatística

Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism 6 para $\alpha=0,05$. Foram aplicados o teste de Kruskal-Wallis com post-hoc test de Dunn.

4 RESULTADOS

Um dos animais do grupo LOT teve uma fratura da raiz mesial do 1ºMID e por isso foi descartado, diminuindo a amostra para 9 espécimes.

A Tabela 1 apresenta os dados dos eventos histomorfométricos associado ao ligamento periodontal e o osso do septo inter-radicular do 1ºMID. As Tabelas 2, 3 e 4 mostram, respectivamente, os dados semi-quantitativos das alterações histomorfométricas na raiz dentária, no ligamento periodontal e osso alveolar.

No período experimental de 7 dias, notou-se que a espessura do ligamento periodontal, área de matriz extracelular não fibrilar e fibras colágenas do tipo I apresentaram aumento nos grupos experimentais, e uma diminuição foi registrada na área de vasos sanguíneos e fibras jovens nos grupos L e LOT. Os perfis nucleares não tiveram alterações significativas entre os grupos. Houve um aumento significativo de células TRAcP positivas nos grupos L e LOT em relação ao grupo controle (Figuras 4 e 5), e também uma diminuição significativa na área óssea do septo inter-radicular nos grupos experimentais (Tabela 1) (Figura 6). Quanto à reabsorção radicular, os espécimes apresentaram em sua maioria ausência de reabsorção, alguns animais dos grupos L e LOT apresentaram áreas ativas e inativas, na sua grande maioria rasas, sem reparo e de pouca extensão (Tabela 2) (Figura 7). O ligamento periodontal apresentou organização uniforme em todos os espécimes e em todos os grupos, não sendo possível a submissão dos dados aos testes estatísticos. Apenas um espécime do grupo LOT apresentou um grande e extenso infiltrado inflamatório (Tabela 3). O grupo LOT apresentou aumento significativo nas áreas de reabsorção óssea, em sua maioria áreas ativas e extensas (Figura 8). Apenas um espécime do grupo LOT apresentou um pequeno ponto de anquilose (Tabela 4).

No período experimental de 30 dias, a espessura do ligamento e a área de vasos sanguíneos, matriz extracelular não fibrilar e número de

perfis nucleares do ligamento periodontal não possuem diferença entre os grupos. Fibras colágenas do tipo III tiveram uma diminuição significativa nos grupos experimentais, e em contrapartida houve um aumento significativo de fibras colágenas tipo I no grupo L (Figura 3). Os grupos L e LOT apresentaram um aumento não significativo de células TRAcP positivas tanto no ligamento periodontal, quanto no osso do septo inter-radicular (Figuras 4 e 5). A área óssea do septo inter-radicular diminuiu nos grupos L e LOT, porém, sem diferença estatística (Tabela 1) (Figura 6). Os grupos L e LOT apresentaram poucas áreas de reabsorção radicular, sendo a maioria inativa e de pouca profundidade e extensão, porém, sem sinais de reparo (Tabela 2) (Figura 7). Em todos os grupos, e em todos os espécimes, o ligamento periodontal permaneceu íntegro, portanto não foi possível a submissão dos dados aos testes estatísticos. Nenhum animal de nenhum grupo apresentou sinais de inflamação (Tabela 3). A reabsorção de osso alveolar aconteceu de maneira significativa nos grupos L e LOT, com presença de áreas ativas de reabsorção, porém, de menor extensão (Figura 8). Nenhum espécime, de nenhum grupo apresentou anquilose (Tabela 4).

4.1 Teste de correlação não paramétrica

Na comparação entre os grupos L e LOT, aos 7 dias, houve uma correlação negativa (Rank Correlation= -0.69, $p=0,005$) entre o número de células TRAcP e a porcentagem de área óssea da região central do septo inter-radicular, bem como uma correlação positiva (Rank Correlation=0.60, $p=0.005$) entre número de células TRAcP do ligamento periodontal e reabsorção radicular. Mostrando que quanto maior o número de células TRAcP menor a área óssea e maior presença de reabsorção radicular, respectivamente. Aos 30 dias estas correlações deixaram de ser estatisticamente significantes.

O número de células TRAcP do ligamento periodontal não mostrou correlação significativa com a extensão e profundidade da reabsorção radicular, nem mesmo com a reabsorção óssea marginal.

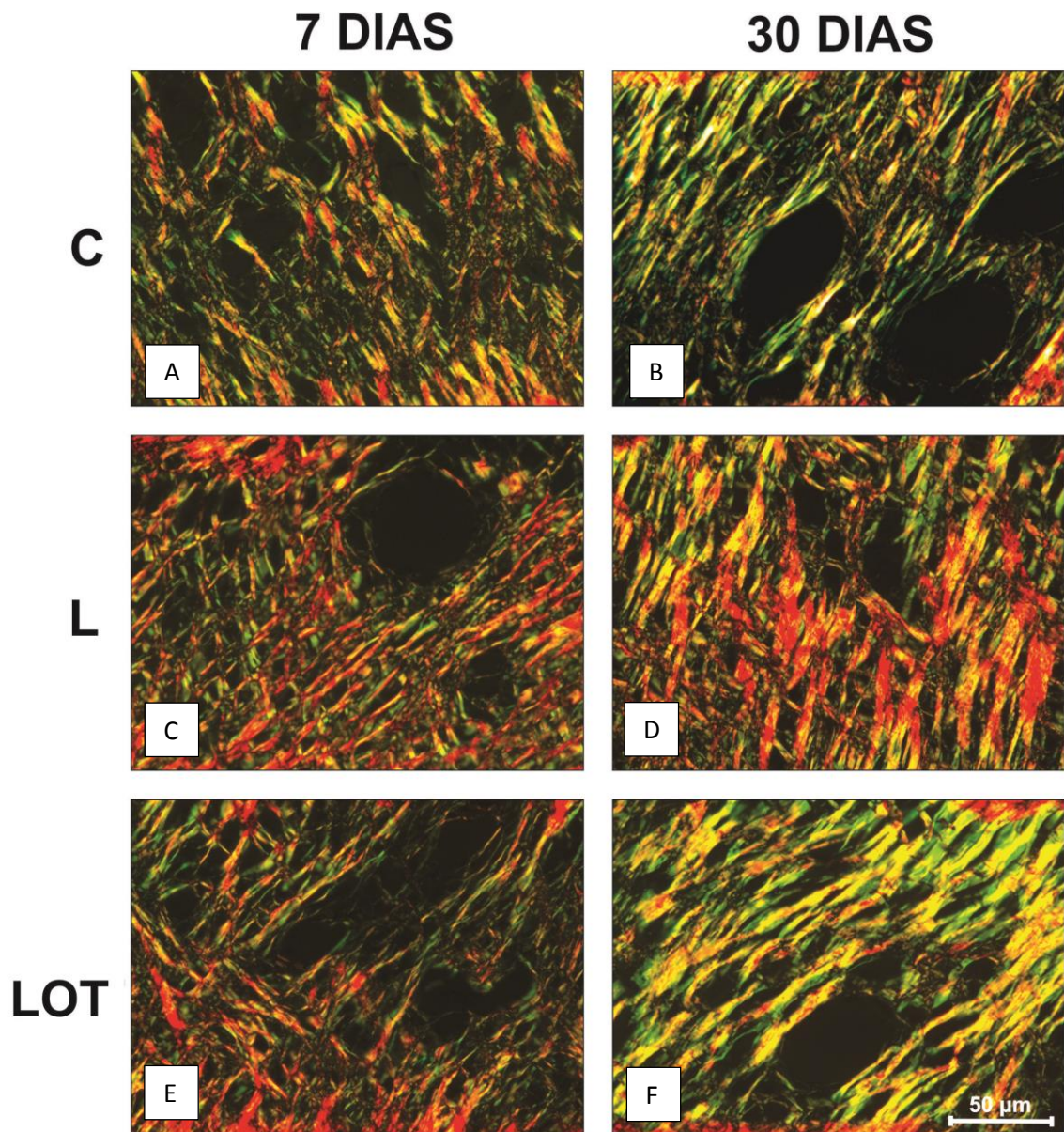
Tabela 1. Análise estatística dos eventos histomorfométricos associado ao ligamento periodontal e o osso alveolar nos grupos experimentais por Kruskal-Wallis com post-hoc test de Dunn com 5% nível de significância. Todos os dados estão expressados em média.

Períodos	Variáveis	Grupos		
		C	L	LOT
7 DIAS	Espessura do Ligamento Periodontal (μm)	128,7 ^A	156,7 ^A	158,9 ^A
	Área de vasos sanguíneos (%)	5,5 ^A	4,9 ^A	4,9 ^A
	Área de matriz extracelular não fibrilar (%)	30,2 ^A	33,9 ^A	36,0 ^A
	Área de fibras colágeno tipo III (%)	76,5 ^A	71,3 ^A	73,9 ^A
	Área de fibras colágeno tipo I (%)	23,4 ^A	27,7 ^A	26,0 ^A
	Perfil Nuclear (n)	403,9 ^A	424,0 ^A	406,3 ^A
	TRAcP-Ligamento Periodontal (n)	1,2 ^A	8,3 ^B	11,9 ^B
	TRAcP- Septo inter-radicular (n)	3,3 ^A	6,7 ^{A,B}	10,3 ^B
	Área óssea do septo inter-radicular (%)	76,7 ^A	51,1 ^B	38,7 ^B
30 DIAS	Espessura do Ligamento Periodontal (μm)	133,1 ^A	120,3 ^A	115,3 ^A
	Área de vasos sanguíneos (%)	6,8 ^A	7,0 ^A	8,7 ^A
	Área de matriz extracelular não fibrilar (%)	26,6 ^A	28,8 ^A	28,5 ^A
	Área de fibras colágenas tipo III (%)	84,7 ^A	72,4 ^B	77,5 ^{A,B}
	Área de fibras colágenas tipo I (%)	15,2 ^A	27,5 ^B	22,4 ^{A,B}
	Perfil Nuclear (n)	440,5 ^A	445,1 ^A	422,1 ^A
	TRAcP-Ligamento Periodontal (n)	2,3 ^A	4,7 ^A	5,4 ^A
	TRAcP- Septo inter-radicular (n)	2,2 ^A	4,1 ^A	4,0 ^A
	Área óssea do septo inter-radicular (%)	84,4 ^A	73,2 ^A	69,1 ^A

Letras maiúsculas iguais representam igualdade estatística entre as colunas

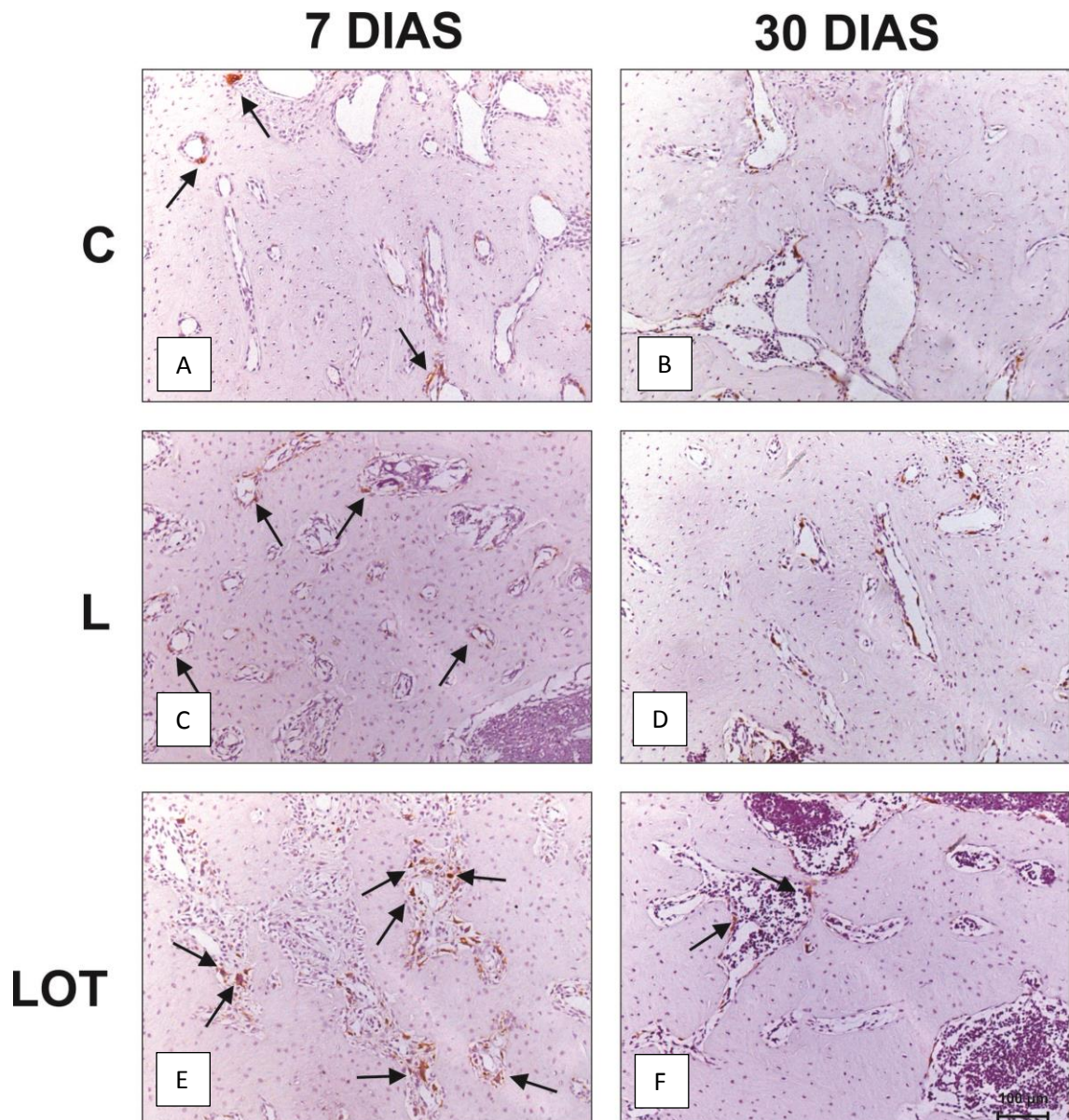
FONTE: Elaborado pelo Autor

Figura 3 – Cortes longitudinais do ligamento periodontal corados em Picrosirius Red em microscopia de luz polarizada. A imagem D mostra um aumento significativo de fibras colágenas do tipo I (vermelhas amareladas) no grupo L no período de 30 dias.



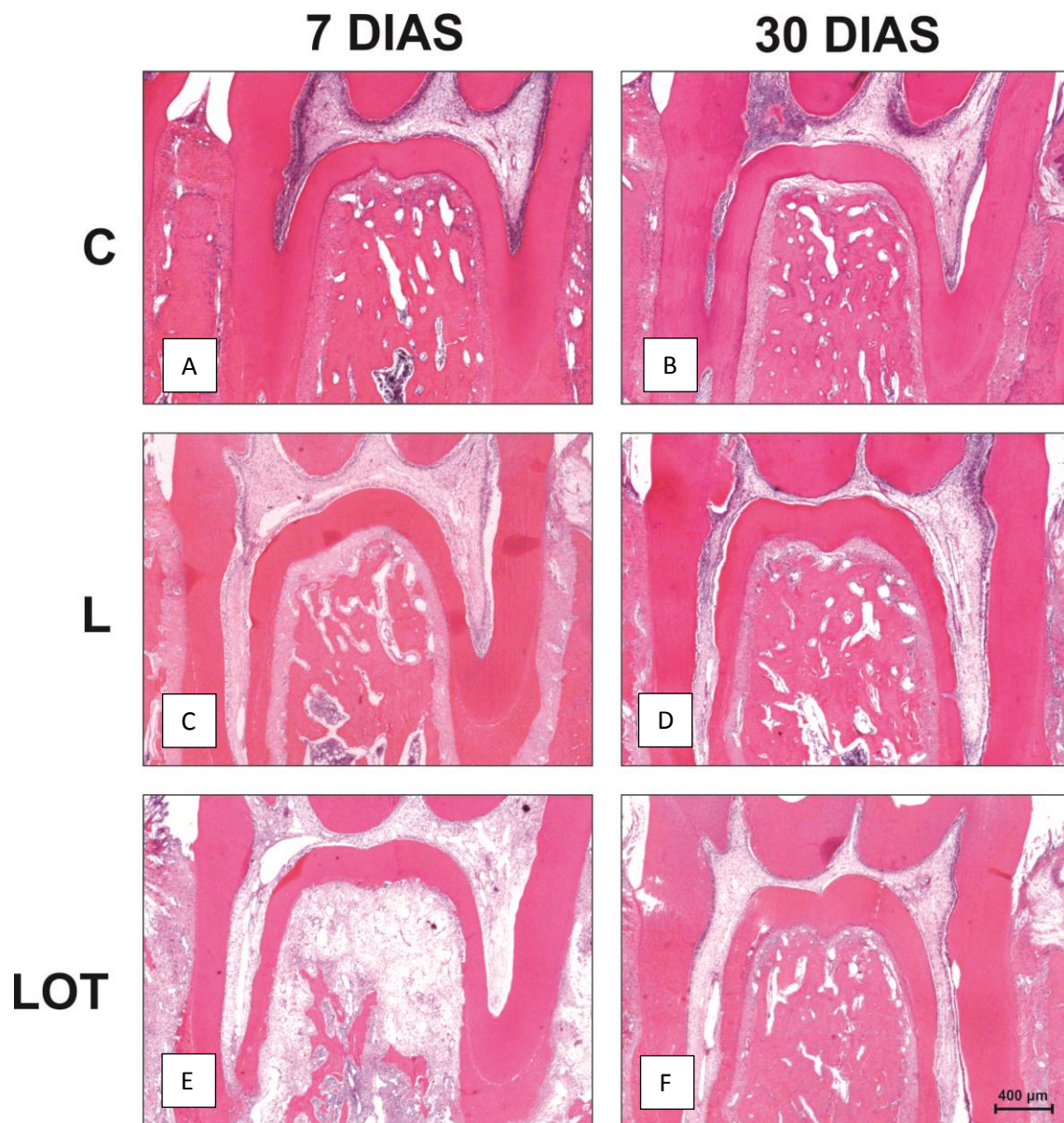
FONTE: Elaborado pelo Autor

Figura 4 – Cortes longitudinais do septo inter-radicular do 1ºMID submetido a técnica imunoistoquímica de detecção de TRAcP em microscopia de luz. As imagens C e E mostram o aumento significativo de células TRAcP nos grupos experimentais em 7 dias. As setas indicam as células imunomarcadas.



FONTE: Elaborado pelo Autor

Figura 6 – Cortes longitudinais do septo inter-radicular do 1ºMID corados em HE sob microscopia de luz. As imagens C e E mostram uma diminuição significativa da área óssea dos grupos experimentais em 7 dias, sendo o grupo LOT (imagem E) o mais afetado.



FONTE: Elaborado pelo Autor

Tabela 2. Distribuição de escores e análise estatística de detalhes histomorfométricos na raiz dental por Kruskal-Wallis com post-hoc test de Dunn com 5% de nível de significância. Os dados estão apresentados em números de eventos.

(continua)

Períodos	Eventos/Escores	Grupos		
7 DIAS	Reabsorção Radicular	C	L	LOT
	1	10/10	6/10	6/10
	2	0/10	1/10	1/10
	3	0/10	0/10	2/10
	4	0/10	3/10	1/10
	Comparação entre os grupos	A	A	A
	Reabsorção Radicular (Extensão)	C	L	LOT
	1	10/10	6/10	6/10
	2	0/10	1/10	3/10
	3	0/10	0/10	1/10
	4	0/10	3/10	0/10
	Comparação entre os grupos	A	A	A
	Reabsorção Radicular (Profundidade)	C	L	LOT
	1	10/10	6/10	6/10
	2	0/10	1/10	4/10
	3	0/10	1/10	0/10
	4	0/10	2/10	0/10
	Comparação entre os grupos	A	A	A
	Reparo da Raiz	C	L	LOT
	1	10/10	6/10	6/10
2	0/10	0/10	0/10	
3	0/10	0/10	0/10	
4	0/10	4/10	4/10	
Comparação entre os grupos	A	A	A	

Tabela 2. Distribuição de escores e análise estatística de detalhes histomorfométricos na raiz dental por Kruskal-Wallis com post-hoc test de Dunn com 5% de nível de significância. Os dados estão apresentados em números de eventos.

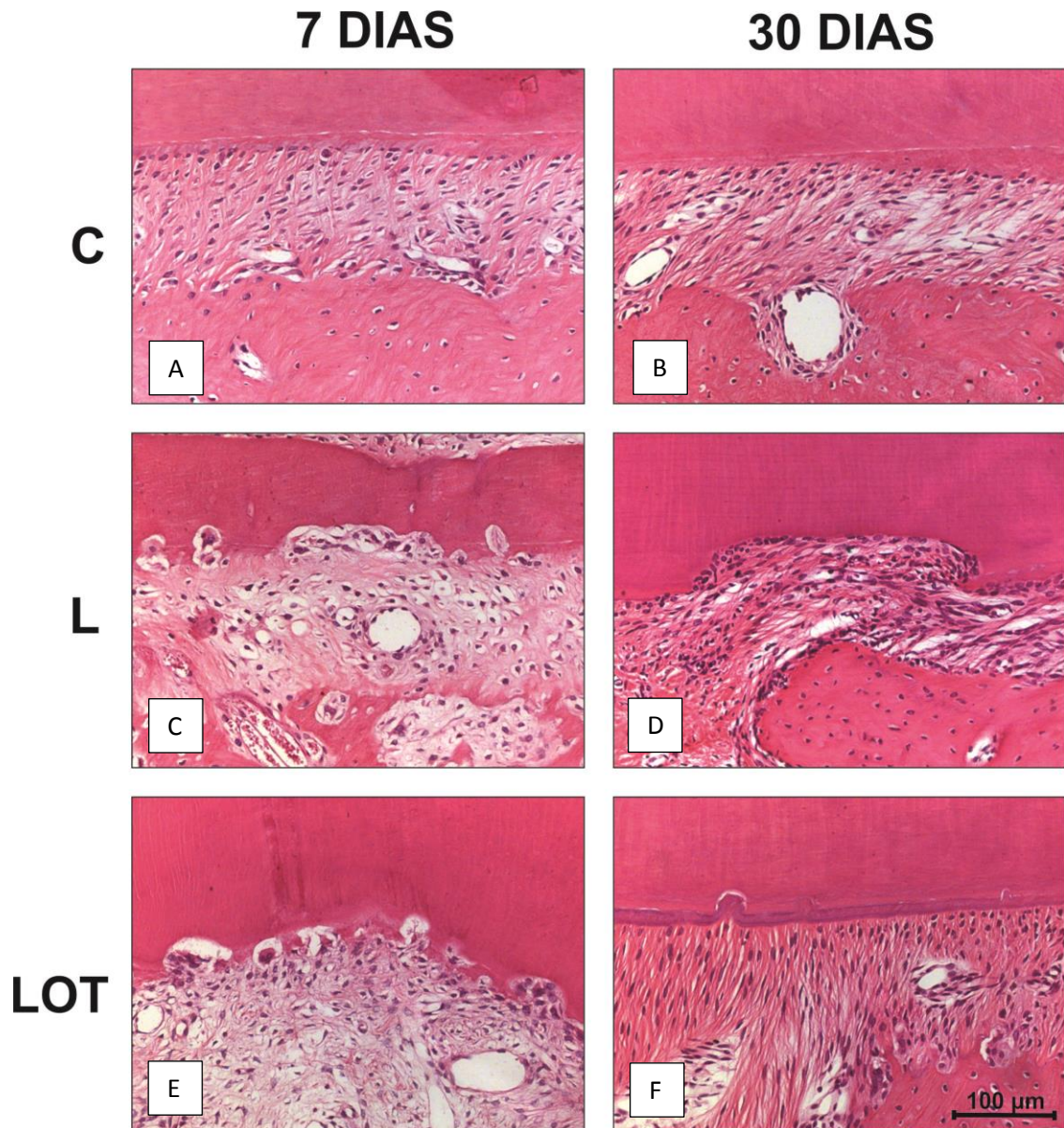
(conclusão)

Períodos	Eventos/Escores	Grupos		
30 DIAS	Reabsorção Radicular	C	L	LOT
	1	10/10	5/10	7/9
	2	0/10	5/10	1/9
	3	0/10	0/10	1/9
	4	0/10	0/10	0/9
	Comparação entre os grupos	A	A	A
	Reabsorção Radicular (Extensão)	C	L	LOT
	1	10/10	5/10	5/9
	2	0/10	2/10	4/9
	3	0/10	2/10	0/9
	4	0/10	1/10	0/9
	Comparação entre os grupos	A	A	A
	Reabsorção Radicular (Profundidade)	C	L	LOT
	1	10/10	5/10	5/9
	2	0/10	4/10	4/9
	3	0/10	1/10	0/9
	4	0/10	0/10	0/9
	Comparação entre os grupos	A	A	A
	Reparo da Raiz	C	L	LOT
	1	10/10	5/10	7/9
2	0/10	0/10	0/9	
3	0/10	0/10	0/9	
4	0/10	5/10	2/9	
Comparação entre os grupos	A	A	A	

Letras maiúsculas iguais representam igualdade estatística entre as colunas

FONTE: Elaborado pelo Autor

Figura 7 – Cortes longitudinais da superfície radicular 1ºMID corados em HE sob microscopia de luz. Os grupos experimentais mostram presença de reabsorções radiculares rasas e pouco extensas. O grupo LOT apresentou casos de recuperação do cimento em 30 dias (F).



FONTE: Elaborado pelo Autor

Tabela 3. Distribuição de escores e análise estatística de detalhes histomorfométricos no ligamento periodontal por Kruskal-Wallis com post-hoc test de Dunn com 5% de nível de significância. Os dados estão apresentados em números de eventos.

(continua)

Períodos	Eventos/Escores	Grupos		
7 DIAS	Organização	C	L	LOT
	1	10/10	10/10	10/10
	2	0/10	0/10	0/10
	3	0/10	0/10	0/10
	4	0/10	0/10	0/10
	Comparação entre os grupos	Não foi possível a análise		
	Intensidade do processo inflamatório	C	L	LOT
	1	10/10	10/10	9/10
	2	0/10	0/10	0/10
	3	0/10	0/10	0/10
	4	0/10	0/10	1/10
	Comparação entre os grupos	A	A	A
	Extensão do processo inflamatório	C	L	LOT
	1	10/10	10/10	9/10
	2	0/10	0/10	0/10
3	0/10	0/10	0/10	
4	0/10	0/10	1/10	
Comparação entre os grupos	A	A	A	

Tabela 3. Distribuição de escores e análise estatística de detalhes histomorfométricos no ligamento periodontal por Kruskal-Wallis com post-hoc test de Dunn com 5% de nível de significância. Os dados estão apresentados em números de eventos.

(conclusão)

Períodos	Eventos/Escores	Grupos		
30 DIAS	Organização	C	L	LOT
	1	10/10	10/10	9/9
	2	0/10	0/10	0/9
	3	0/10	0/10	0/9
	4	0/10	0/10	0/9
	Comparação entre os grupos	Não foi possível a análise		
	Intensidade do processo inflamatório	C	L	LOT
	1	10/10	10/10	9/9
	2	0/10	0/10	0/9
	3	0/10	0/10	0/9
	4	0/10	0/10	0/9
	Comparação entre os grupos	A	A	A
	Extensão do processo inflamatório	C	L	LOT
	1	10/10	10/10	9/9
	2	0/10	0/10	0/9
3	0/10	0/10	0/9	
4	0/10	0/10	0/9	
Comparação entre os grupos	A	A	A	

Letras maiúsculas iguais representam igualdade estatística entre as colunas

FONTE: Elaborado pelo Autor

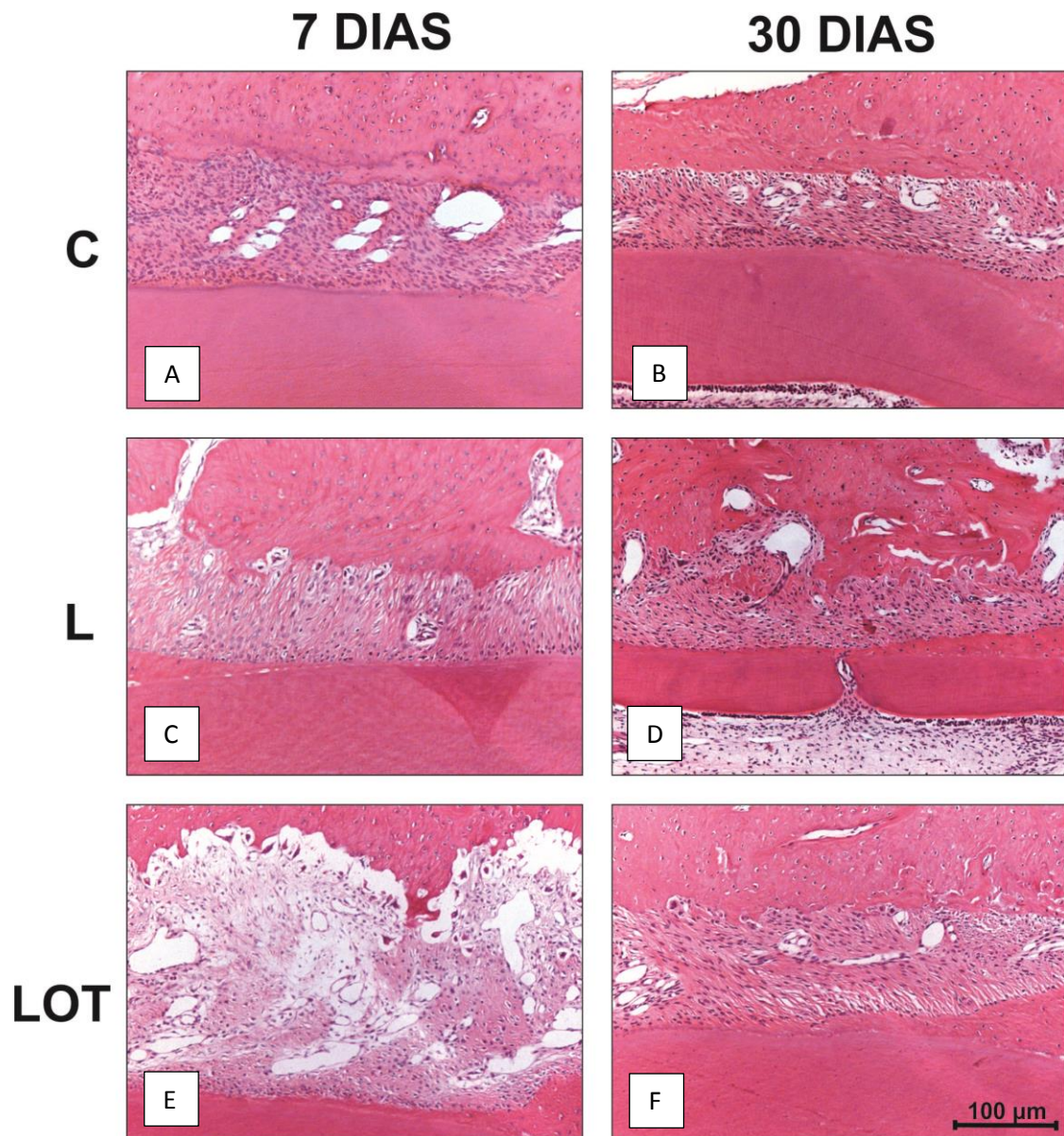
Tabela 4. Distribuição de escores e análise estatística de detalhes histomorfométricos no osso alveolar por Kruskal-Wallis com post-hoc test de Dunn com 5% de nível de significância. Os dados estão apresentados em números de eventos.

Períodos	Eventos/Escores	Grupos		
7 DIAS	Reabsorção óssea	C	L	LOT
	1	10/10	7/10	1/10
	2	0/10	0/10	1/10
	3	0/10	2/10	3/10
	4	0/10	1/10	5/10
	Comparação entre os grupos	A	A,B	B
	Anquiose	C	L	LOT
	1	10/10	10/10	9/10
	2	0/10	0/10	1/10
	3	0/10	0/10	0/10
4	0/10	0/10	0/10	
Comparação entre os grupos	A	A	A	
30 DIAS	Reabsorção óssea	C	L	LOT
	1	10/10	1/10	1/9
	2	0/10	0/10	0/9
	3	0/10	9/10	7/9
	4	0/10	0/10	1/9
	Comparação entre os grupos	A	B	B
	Anquiose	C	L	LOT
	1	10/10	10/10	9/9
	2	0/10	0/10	0/9
	3	0/10	0/10	0/9
4	0/10	0/10	0/9	
Comparação entre os grupos	A	A	A	

Letras maiúsculas iguais representam igualdade estatística entre as colunas

FONTE: Elaborado pelo Autor

Figura 8 – Cortes longitudinais do ligamento periodontal do 1ºMID corados em HE sob microscopia de luz. A imagem E mostra um aumento significativo nas áreas de reabsorção óssea marginal no grupo LOT em 7 dias. O aumento significativo de reabsorção óssea marginal nos grupos experimentais em 30 dias estão representados pelas imagens D e F.



FONTE: Elaborado pelo Autor

5 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou as alterações histomorfométricas e imunoistoquímicas das estruturas de suporte do dente submetido à luxação extrusiva e a interferência da oclusão traumática no processo de reparo dos tecidos de suporte destes dentes.

A técnica para o estabelecimento da oclusão traumática utilizada possivelmente promove uma adaptação da posição dentária e diminuição da incidência dos movimentos laterais e oblíquos pela intrusão do dente avulsionado, sendo que força axial provocada pela oclusão traumática é contrária ao movimento extrusivo, nos grupos LOT, além de sofrer desgaste da plataforma oclusal ao longo do tempo diminuindo o impacto de forças mecânicas nestes dentes. Esses fatores provavelmente explicam o porquê não houve diferença na perda óssea marginal aos 30 dias e que em ambos os períodos, a espessura do ligamento periodontal e as áreas de matriz extracelular e vasos sanguíneos não tiveram diferença significativa no grupo LOT.

A luxação extrusiva apresentou um aumento de células positivas para a enzima TRAcP positivas e uma consequente reabsorção óssea alveolar e rarefação óssea na região do septo inter-radicular em curto prazo. Contudo a oclusão traumática associada à luxação extrusiva acentua a presença destas células no septo inter-radicular. E consequentemente há um aumento da degradação óssea tanto no septo inter-radicular em curto prazo (7 dias), tanto quanto no osso marginal a longo prazo (30 dias).

Correlacionando os grupos submetidos a luxação extrusiva, observou-se que a oclusão traumática estava associada a presença de células TRAcP no septo do osso alveolar e consequentemente a redução da área óssea, aos 7 dias. Esta remodelação óssea acontece devido a adaptação e rearranjo do periodonto de sustentação nos dentes submetidos a luxação extrusiva e a oclusão traumática. As interfaces e

tecidos do periodonto de sustentação possuem mecanismos para alívio de estresse por meio da deformação dos componentes minerais, das proteínas fibrilares e globulares, sangue e fluido intersticial.¹⁸ A dificuldade de fluxo de fluidos na região central do septo inter-radicular e a desmineralização,¹⁹ dificultam o alívio das cargas mecânicas, possivelmente explicando uma maior intensidade de remodelação óssea na região central do septo inter-radicular. Aos 30 dias, esta correlação deixa de ser significativa possivelmente por uma redução na intensidade da remodelação óssea devido a readequação do posicionamento dentário.¹⁹

Estímulos mecânicos são essenciais para a manutenção da homeostase do ligamento periodontal. Contudo, a oclusão traumática promove estímulos de grande intensidade e frequência que podem ser nocivos ao periodonto provocando a supressão da proliferação de fibroblastos e o aumento da produção de mediadores inflamatórios pelo tecido conjuntivo, como a interleucina 6.²⁰ A interleucina 6 é um forte ativador de osteoclastos na presença de carga mecânica compressiva sobre o ligamento periodontal, conseqüentemente o aumento de interleucina 6 pode estar relacionados a reabsorção óssea e dentária em casos de oclusão traumática.²¹

A anquilose é incomum nesses tipos de injúria,^{3,22} condizendo com o que foi apresentado nesse estudo.

Este estudo trabalha com ratos jovens, não realizou a contenção dentária e reposicionou o dente imediatamente após o trauma. O aparecimento de infiltrado inflamatório e conseqüentemente reabsorções radiculares inflamatórias estão relacionados à danificação do cimento, contaminação pulpar, onde as toxinas de bactérias podem afetar o ligamento via túbulos dentinários.²³ Outros tipos de traumatismos, como as intrusões, possuem taxas de reabsorção inflamatórias muito maiores quando comparada a luxação extrusiva, por conta do alto dano ao

ligamento periodontal e da polpa.⁹ Os atrasos no atendimento em casos de luxação extrusiva podem provocar necrose pulpar e conseqüentemente piora do prognóstico.²⁴ Sendo assim, o rápido reposicionamento da técnica de luxação deste modelo experimental diminui a incidência de danos ao cimento, contaminação pulpar e proporciona um melhor prognóstico, o que provavelmente justifica o fato de que a presença de inflamação foi um evento raro nesse estudo, além de a espessura do ligamento periodontal e as áreas de matriz extracelular e vasos sanguíneos não apresentarem diferença significativa no grupo L e também poucas áreas de reabsorção radicular encontradas serem pequenas e inativas, que são raras nos casos de luxação extrusiva,²⁵ condizendo com os dados encontrados.

A estabilidade dos perfis nucleares evidencia que a luxação extrusiva, mesmo quando associada à oclusão traumática, não causa morte celular em massa no ligamento periodontal nesse tipo de estudo. A organização do ligamento periodontal, se deve a manutenção da camada celular do cimento, que é essencial para a recuperação do ligamento periodontal.²⁶ Um aspecto irregular em algumas regiões das fibras foi notado nos grupos L e LOT, o que já foi notado em casos semelhantes.⁷

A perda óssea em casos de luxação extrusiva, está ligada a idade do paciente, ao deslocamento dentário após o trauma ocorrido e duração da contenção.²⁷ As contenções são importantes e recomendadas em casos de luxação extrusiva.^{4,28} Os dados apresentados neste estudo reforçam a importância do reposicionamento dos dentes por contenção para diminuição da reabsorção óssea do septo alveolar e para a cicatrização do ligamento periodontal,²⁹ além de diminuir a mobilidade dentária e o desconforto do paciente durante o processo de reparo das estruturas afetadas no trauma.

A aplicação de forças mecânicas nas células do ligamento também estimulam uma remodelação da matriz extracelular pelos fibroblastos como resposta para a manutenção da homeostase do ligamento

periodontal.³⁰ A expressão de colágeno se altera de acordo com as mudanças ocorridas na estrutura e desenvolvimento do ligamento periodontal.³¹ O ligamento periodontal possui uma alta quantidade de colágeno do tipo III, o que pode estar relacionado a função de manutenção da interface osso-ligamento-cimento e também a rápida recuperação do ligamento periodontal.³² Em processos de cicatrização, há um aumento de colágeno tipo III nas fases iniciais, e posteriormente o colágeno imaturo do tipo III é substituído por colágeno do tipo I.³² Cargas mecânicas de estiramento em baixa intensidade aumentam a produção de fibras colágenas do tipo I.³³ O que possivelmente pode justificar neste modelo o aumento destas fibras no grupo L é que a mesa oclusal dos dentes posteriores dos ratos apresentam cúspides inclinadas que favorecem a incidência de forças laterais e oblíquas que podem provocar um estiramento das fibras do ligamento periodontal.

Segundo Chen et al.³³ a carga mecânica tanto de 3% como 10% de tensão influenciam mais a formação de colágeno tipo I do que tipo III, sendo que, as forças de tensões mais brandas (3%) aumentam significativamente a produção de colágeno do tipo I. Nos casos de luxação extrusiva, o rompimento das fibras colágenas característico da injúria tem como uma possível consequência, a diminuição nas forças de estiramento sobre as fibras, o que possivelmente justifica o aumento da proporção de fibras colágenas do tipo III nos espécimes do grupo L em 30 dias.

Devido a esses fatos, este estudo mostra a importância do ajuste oclusal, para prevenção de danos nos tecidos de suporte, no tratamento de casos que envolvem a luxação extrusiva, o que não é citado nos protocolos encontrados na literatura.^{4,28}

6 CONCLUSÃO

Dentro das limitações do modelo experimental, este estudo mostrou que a oclusão traumática prejudicou o reparo das estruturas de suporte de dentes que sofreram luxação extrusiva a curto prazo.

REFERENCIAS

1. Glendor U, Marcenes W, Andreasen JO. Classification, Epidemiology and Etiology. In: Andreasen JO, Andreasen FM, Andersson L, editors. Textbook and color atlas of traumatic injuries to the teeth. 4th ed. Oxford, UK: Blackwell Munksgaard; 2007. p. 217-54.
2. Andreasen FM, Andreasen JO. Extrusive Luxation and Lateral Luxation. In: Andreasen JO, Andreasen FM, Andersson L, editors. Textbook and color atlas of traumatic injuries to the teeth. 4th ed. Oxford, UK: Blackwell Munksgaard 2007. p. 411-27.
3. Hermann NV, Lauridsen E, Ahrensburg SS, Gerds TA, Andreasen JO. Periodontal healing complications following extrusive and lateral luxation in the permanent dentition: a longitudinal cohort study. *Dent Traumatol.* 2012;28(5):394-402.
4. 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(2):66-71.
5. Martins WD, Westphalen VP, Perin CP, Da Silva Neto UX, Westphalen FH. Treatment of extrusive luxation by intentional replantation. *Int J Paediatr Dent.* 2007;17(2):134-8.
6. Hamanaka EF, Nogueira LM, Pires WR, Panzarini SR, Poi WR, Sonoda CK. Replantation as treatment for extrusive luxation. *Braz Dent J.* 2015;26(3):308-11.
7. Miyashin M, Kato J, Takagi Y. Experimental luxation injuries in immature rat teeth. *Endod Dent Traumatol.* 1990;6(3):121-8.
8. Miyashin M, Kato J, Takagi Y. Tissue reactions after experimental luxation injuries in immature rat teeth. *Endod Dent Traumatol.* 1991;7(1):26-35.

9. Hecova H, Tzigkounakis V, Merglova V, Netolicky J. A retrospective study of 889 injured permanent teeth. *Dent Traumatol.* 2010;26(6):466-75.
10. Andreasen JO, Andreasen FM, Skeie A, Hjorting-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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Junqueira LC, Montes GS, Sanchez EM. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. *Histochemistry.* 1982;74(1):153-6.

17. 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. *Dent Traumatol.* 2007;23(5):265-72.
18. Lin JD, Özcoban H, Greene JP, Jang AT, Djomehri SI, Fahey KP, et al. Biomechanics of a bone-periodontal ligament-tooth fibrous joint. *J Biomech.* 2013 1;46(3):443-9.
19. Brandini DA, Amaral MF, Poi WR, Casatti CA, Bronckers AL, Everts V, et al. The effect of traumatic dental occlusion on the degradation of periodontal bone in rats. *Indian J Dent Res.* 2016;27(6):574-580.
20. Wu J, Li Y, Fan X, Zhang C, Wang Y, Zhao Z. Analysis of gene expression profile of periodontal ligament cells subjected to cyclic compressive force. *DNA Cell Biol.* 2011;30(11):865-73.
21. Lee YH, Nahm DS, Jung YK, Choi JY, Kim SG, Cho M, et al. Differential gene expression of periodontal ligament cells after loading of static compressive force. *J Periodontol.* 2007 Mar;78(3):446-52.
22. Lauridsen E, Blanche P, Yousaf N, Andreasen JO. The risk of healing complications in primary teeth with extrusive or lateral luxation-A retrospective cohort study. *Dent Traumatol.* 2017;33(4):307-316.
23. Trope M. Luxation injuries and external root resorption--etiology, treatment, and prognosis. *J Calif Dent Assoc.* 2000;28(11):860-6.
24. Lima TFR, Silva EJNLD, Gomes BPF, Almeida JFA, Zaia AA, Soares AJ. Relationship between Initial Attendance after Dental Trauma and Development of External Inflammatory Root Resorption. *Braz Dent J.* 2017;28(2):201-205.
25. Lee R, Barrett EJ, Kenny DJ. Clinical outcomes for permanent incisor luxations in a pediatric population. II. Extrusions. *Dent Traumatol.* 2003;19(5):274-9.

26. Andreasen JO. Pulp and periodontal tissue repair - regeneration or tissue metaplasia after dental trauma. A review. *Dent Traumatol.* 2012;28(1):19-24. Review.
27. Oikarinen K, Gundlach KK, Pfeifer G. Late complications of luxation injuriesto teeth. *Endod Dent Traumatol.* 1987;3(6):296-303.
28. Diangelis AJ, Andreasen JO, Ebeleseder KA, Kenny DJ, Trope M, Sigurdsson A, et al. 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 ;28(1):2-12. Erratum in: *Dent Traumatol.* 2012;28(6):499.
29. Ben Hassan MW, Andersson L, Lucas PW. Stiffness characteristics of splints for fixation of traumatized teeth. *Dent Traumatol.* 2016;32(2):140-5.
30. Lekic P, McCulloch CA. Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Rec.* 1996;245(2):327-41. Review.
31. Karimbux NY, Rosenblum ND, Nishimura I. Site-specific expression of collagen I and XII mRNAs in the rat periodontal ligament at two developmental stages. *J Dent Res.* 1992;71(7):1355-62.
32. Kaku M, Yamauchi M. Mechano-regulation of collagen biosynthesis in periodontalligament. *J Prosthodont Res.* 2014;58(4):193-207. Review.
33. Chen YJ, Jeng JH, Chang HH, Huang MY, Tsai FF, Yao CC. Differential regulation of collagen, lysyl oxidase and MMP-2 in human periodontal ligament cells by low- and high-level mechanical stretching. *J Periodontal Res.* 2013;48(4):466-74.

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 2014-00432, 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: 26 de Março de 2016.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 26 de Abril de 2016.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Effect of traumatic occlusion in the repair process of teeth with luxation**", Protocol FOA nº 2014-00432, 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: March 26, 2016.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: April 26, 2016.

Prof. Dr. Edilson Eryolino
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- 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](#)
gas

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 peer-reviewed 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 or techniques and case reports. The journal focuses on the following areas **as they relate to dental trauma**:

Epidemiology and Social Aspects
 Periodontal and Soft Tissue Aspects
 Endodontic Aspects
 Pediatric and Orthodontic Aspects
 Oral and Maxillofacial Surgery / Transplants/ Implants
 Esthetics / Restorations / Prosthetic Aspects
 Prevention and Sports Dentistry
 Epidemiology, Social Aspects, Education and Diagnostic Aspects.

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 following ethical guidelines for publication and research.

2.1. Authorship and Acknowledgements

Authors submitting a paper to the journal do so on the understanding that the manuscript has been read and approved by all authors and that all authors have agreed to submit the manuscript to the Journal. ALL authors MUST have made an active and significant contribution to the development of the concept and/or design of the study, and/or analysis and interpretation of the data and/or the writing of the paper. ALL authors must have critically reviewed its content and must have approved the final version that is submitted to the journal for consideration 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, the criteria for authorship should be based on: 1) substantial contributions to the concept 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 declared as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under the Acknowledgements section on the title page.

Acknowledgements: In the Acknowledgements section, you can specify contributors to the article other than the authors. The acknowledgements should be placed on the title page, and not in the main document, in order to allow blinded review.

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 and/or institution 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, it is a requirement that all authors submitting manuscripts to *Dental Traumatology* 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 within the title page, and not in the main document, in order to allow blinded review.

2.6 Appeal of Decision

The Editor's decision to accept, reject or require revision of a paper is final and it 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 the permission in writing and to provide copies to the Publishers of Dental Traumatology.

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 of 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 the paper 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.

Production Editor

John Wiley & Sons Singapore Pte Ltd

Email: edt@wiley.com

2.9 OnlineOpen

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 being 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.

2.10 Data Sharing and Data Accessibility

The journal encourages authors to share the data and other artefacts supporting the results in the paper by archiving it in an appropriate public repository. Authors should include a data accessibility statement, including a link to the repository they have used, in order that this statement can be published alongside their paper.

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 are available online and below. Further assistance can be obtained from the Editorial Office: EDToffice@wiley.com.

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 (e.g. the Abstract) 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 that you are asked to review at the end of the submission process. The files viewable in the HTML and PDF format are the files that will be made available to the reviewers during the review process.

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rtf) 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 the abstract, text, references, tables, and figure legends (in that sequence), but no embedded figures. In the text, please reference figures as 'Figure 1', 'Figure 2' etc in order to match the tag name you choose for the individual figure files that you upload. 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 a double blinded review process – hence, the names of the reviewers will not be disclosed to the author(s) who have submitted the 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 the title page under the file designation 'main document'
- Figure files under the file designation 'figures' – each figure should be uploaded individually
- 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 files that you will be asked to review at the end of the submission process. The files viewable in the HTML and PDF format are the files that will be available to the reviewers during 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, you may suggest the names and current email addresses of potential international reviewers whom you consider capable of reviewing your manuscript. Please note that these are suggestions only and the Editor may or may not invite the suggested people to review your paper. In addition to any suggestions you make, the journal editor will choose one or two independent reviewers.

When the review is completed you will be notified under the 'Manuscripts with decision' section and via an e-mail message.

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

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to continue and 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 spam filtering in 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) at 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 when you upload your revised manuscript. Please also remember to upload your manuscript document separate from your title page. Any new files should be uploaded and designated correctly.

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, Periodontal and Soft Tissue Aspects, Endodontic Aspects, Pediatric and Orthodontic Aspects, Oral and Maxillofacial Surgery/Transplants/Implants, Esthetics/Restorations/Prosthetic Aspects, Prevention and Sports Dentistry, Epidemiology, Social Aspects, Education and Diagnostic Aspects.

Review Papers: *Dental Traumatology* commissions specific topical review papers and mini reviews of small areas of interest. 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 pre and submission. Comprehensive review articles should include a description of search strategy of the relevant literature, the inclusion criteria, method for evaluation of papers, level of evidence, etc.

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

Case Reports: *Dental Traumatology* may accept Case Reports that illustrate unusual and clinically relevant observations or management. Case reports should demonstrate something new or unique, and they should not present common clinical scenarios. Case reports should be kept brief (within 3-4 printed pages) and need not follow the usual division into material and methods etc. There should be an Abstract written as a short paragraph. The Abstract should not be structured with specific sections (i.e. do not use aims, methods, results, conclusions). The Introduction should be kept short. Thereafter the case is described followed by a short Discussion. Case reports should have adequate follow-up to demonstrate the outcome of the treatment provided or the long-term prognosis of the presented problem. Typically, cases with treatment should have at least 4-5 years follow-up radiographs, photographs, etc to show the outcome. Case reports are subject to peer review.

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 may be accepted for 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 high scientific and high clinical practice standards. Short communications are subject to peer review.

Letters to the Editor may be considered for publication if they are of broad interest to dental traumatology. They may deal with material in papers already published in *Dental Traumatology* or they may raise new issues, but they should have important implications for dental traumatology.

Meetings: advance information about and reports from international meetings are welcome, but should not be submitted via the online submission site – these should be sent directly to the Editorial Office: EDToffice@wiley.com

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. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are to be paid for, and arranged by, the author. The use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication, nor does it guarantee that no further editing will be required as that is at the discretion of the Editor of the journal.

Scientific papers should not be written in the 1st person – that is, avoid using “we”, “our”, etc. As examples, Use the ‘current study’, “the results”, “samples were tested”, instead of “our study”, “our results”, “we tested”, etc.

Care must be taken with the use of tense, and use of singular and plural words.

Numbers may be written as numbers or spelt out as words, according to the context in which the number is being used. In general, if the number is less than 10, it should be spelt out in words (e.g. five). If the number is 10 or greater, it should be expressed as a number (e.g. 15). When used with units of measurement, it should be expressed as a number (e.g. 5mm, 15mL).

When referring to a figure at the beginning of a sentence, spell the word out (e.g. *Figure 2 shows the patient's injuries on initial presentation*). When referring to a figure as part of the sentence, use the abbreviation “Fig.” (e.g. *The pre-operative radiograph shown as Fig. 3 demonstrates the degree of displacement of the tooth*). When referring to a figure at the end of a sentence, use the abbreviation “Fig.” and enclose it in parentheses - e.g. *The patient's maxillary central incisor was repositioned and splinted (Fig. 5)*.

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 – otherwise they should not be used. The full words should be written out completely in the text when

first used, followed by the abbreviation in parentheses. 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.

As Dental Traumatology is an international journal with wide readership from all parts of the world, the FDI Tooth Numbering system MUST be used. This system uses two digits to identify teeth according to quadrant and tooth type. The first digit refers to the quadrant and the second digit refers to the tooth type. – for example: tooth 11 is the maxillary right central incisor and tooth 36 is the mandibular left first molar. Alternatively, the tooth can be described in words. Other tooth numbering systems will not be accepted.

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, do not use Japanese or other Asian fonts. Do not use automated or manual hyphenation. Use double spacing and left alignment of text when preparing the manuscript. Do not use Arabic or other forms of software that automatically align text on the right.

5.2. Structure

All papers submitted to Dental Traumatology should include: Title Page, Abstract, Main text, References and Table Legends, Figure Legends, Tables, Figures, Conflict of Interest Statement and Acknowledgements where appropriate. The 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. Tables should be included as part of the Main Document. Figures should be uploaded as separate files and must not be embedded in the Main Document. Manuscripts must conform to the journal style. Manuscripts not complying with the journal style will be rejected and returned to the author(s) without being peer reviewed.

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. Hence, authors should number all of the pages consecutively at the bottom of the page.

Title Page: The Title page should be uploaded as a separate document in the submission process under the file designation 'Title Page' to allow blinded review. The Title page 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. The title page should also include a running title of no more than 60 characters and 3-6 keywords.

The title of the paper should be concise and informative with major key words. The title should not be a question about the aim and it should not be a statement of the results or conclusions.

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 a brief background statement plus the essential purpose and message of the paper in an abbreviated form. For Original Scientific Articles, the abstract should be structured with the following headings: Background/Aim, Material and Methods, Results and Conclusions. For other article types (e.g. Case Reports, Reviews Papers, Short Communications) headings are not required and the Abstract should be in the form of a paragraph briefly summarizing the paper.

Main Text of Original Articles should be divided into the following sections: Introduction, Material and Methods, Results and Discussion, References, Legends to Tables, Legends to Figures, and the Tables.

Introduction This section should be focused, outlining the historical or logical origins of the study. It should not summarize the results and 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 an explicit, but brief, statement of the specific aims of the investigation or hypothesis tested. Do not include details of the methods in the statement of the aims.

Materials and Methods This section 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 modified methods. Identify precisely all drugs used by their 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 and institution 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 clearly and simply present the observations/results without reference to other literature

and without any interpretation of the data. Present the results in a 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 usually starts with a brief summary of the major findings. Repetition of parts of the Introduction or of the Results sections should be avoided. Statements and interpretation of the data should be appropriately supported by original references. A comment on the potential clinical relevance of the findings should be included. The Discussion section should end with a brief conclusion but the conclusion should not be a repeat of the results and it should not extrapolate beyond the findings of the study. Link the conclusions to the aim of the study.

Do not use sub-headings in the Discussion section, The Discussion should flow from one paragraph to the next in a cohesive and logical manner.

Main Text of Review Articles should comprise 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, specify contributors to the article other than the authors. 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.

The references should be numbered consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. Identify references in the text, 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. Authors can also review previous articles published in the journal to see the style used for references.

Authors are advised to use 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

[Examples of reference styles used by *Dental Traumatology*](#)

[Journal Articles:](#)

Taniura S, Tatebayashi K, Akatsuka K, et al. Transoral penetration of a half-split chopstick between the basion and the dens. AJNR Am J Neuroradiol. 2004;25:871-872.

Text book chapters:

Andreasen J, Andreasen F. Classification, etiology and epidemiology. IN: Andreasen JO, Andreasen FM, eds. Textbook and Color Atlas of Traumatic Injuries to the Teeth. 3rd Edn. Munksgaard, Copenhagen. 1994;151-80.

Thesis or Dissertation:

Lauridsen, E. Dental trauma – combination injuries. Injury pattern and pulp prognosis for permanent incisors with luxation injuries and concomitant crown fractures. Denmark: The University of Copenhagen. 2011. PhD Thesis.

Corporate Author:

European Society of Endodontology. Quality guidelines for endodontic treatment: consensus report of the European Society of Endodontology. Int Endod J 2006;39:921-30.

American Association of Endodontists. The treatment of traumatic dental injuries. Available at: URL:

'http://www.aae.org/uploadedfiles/publications_and_research/newsletters/endodontics_colleagues_for_excellence_newsletter/ecfe_summer2014_final.pdf'. Accessed September 2015.