



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

CAIO VINÍCIUS LOURENÇO DEBORTOLI

**Avaliação das alterações teciduais do complexo dentino-
pulpar de dentes de ratos submetidos à luxação extrusiva
associada ou não à oclusão traumática**

**Araçatuba - SP
2021**

CAIO VINÍCIUS LOURENÇO DEBORTOLI

Avaliação das alterações teciduais do complexo dentino-pulpar de dentes de ratos submetidos à luxação extrusiva associada ou não à oclusão traumática

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Odontologia – Área de concentração em Clínica Integrada.

Orientadora: Prof. Dra. Daniela Atili Brandini de Weert

**Araçatuba - SP
2021**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

D287a Debortoli, Caio Vinicius Lourenço.
Avaliação das alterações teciduais do complexo
dentino-pulpar de dentes de ratos submetidos à
luxação extrusiva associada ou não à oclusão
traumática / Caio Vinicius
Lourenço Debortoli. - Araçatuba, 2021
59 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Daniela Atili Brandini de Weert

1. Traumatismos dentários 2. Polpa dentária 3. Oclu-
são dentária traumática 4. Doenças da polpa dentária
I. Título.

Black D2
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

A Jesus Cristo, meu salvador, amigo, razão da minha existência e por quem eu vivo todos os meus dias. Deu-me 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.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba **Prof. Dr. Glauco Issamu Miyahara** e do vice-diretor **Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem**.

A minha orientadora **Prof^a. Dr^a. Daniela Atili Brandini de Weert**, que, com brilhantismo e cuidado, me ensinou, contribuindo para meu desenvolvimento científico, intelectual e pessoal. 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. Minha eterna gratidão.

A minha esposa e companheira **Daniella Filié Cantieri Debortoli**, que sempre esteve presente, como um oásis em meio às dificuldades. Dedico-te todo meu amor!

Aos meus pais, **Celso Debortoli, Meire Regina Lourenço Debortoli e minha irmã Heloisa Lourenço Debortoli**, minhas referências de bondade, honestidade, longanimidade, perseverança e acima de tudo, fé e amor. Tudo que sou devo a eles.

Aos professores da disciplina de **Clínica Integrada** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, **Celso Koogi Sonoda, Denise Pedrini, Sônia Panzarini, Wilson Roberto Poi e José Carlos Monteiro**, pelos ensinamentos, pelo ótimo convívio e aprendizado de todos esses anos.

Ao **Prof. Dr. Claudio Aparecido Casatti** e o **Departamento de Ciências Básicas**, pelo desenvolvimento conjunto desse trabalho, além do convívio harmonioso e agradável.

A **Prof^a. Dr^a. Sandra Rahal Mestrener** e todos da **Rahal Odontologia** que me acolheram com muito carinho e têm me ensinado e orientado dentro dos caminhos da odontologia.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** - Código de Financiamento 001, pela concessão de bolsa, que foi de grande importância para realização desse trabalho.

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 meus colegas de pós-graduação, **Marina Fuzette Amaral, Luiza Monzoli Côvre, Gestter William Lattari Tessarin, Lourenço Vieira Tereza Canevari, Leonardo Raniel Figueiredo, Ana Paula Linhares, Lui da Costa, Ana Laura Albuquerque e Aline Takamiya** pela amizade e força na realização dessa etapa. Vocês são alunos inspiradores e companheiros de extrema competência e comprometimento.

Aos **alunos e pacientes** da disciplina de **Clínica Integrada** e do **Projeto de Extensão Universitária “Reabilitação social e da saúde bucal após o traumatismo dentoalveolar”** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, que foram essenciais para meu aprendizado e preparação para a carreira docente.

Aos **funcionários e professores** do departamento de Diagnóstico e Cirurgia, pela ajuda e dedicação.

A **todo o quadro de funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba** que se dedicam em meio às dificuldades para promover uma universidade de excelência.

Aos meus pastores **Alfredo Nogueira, Thelma Soccio Nogueira, Eliseu e Juliana Nogueira**, que se empenham no cuidado e amor por mim e os que me cercam.

Aos meus amigos **Marcos Renan, Kevin e Rafael**, pela paciência e companheirismo de sempre, além do apoio.

Aos meus sogros **Vladimir Cantieri e Milena Elaine Filié** e meu cunhado **Daniel Cantieri** que me acolheram como parte da família e torcem pelo meu sucesso.

*“O homem não teria alcançado o possível se,
repetidas vezes, não tivesse tentado o impossível.”*

Max Weber

Debortoli, C. V. L. (2021). *Avaliação das alterações teciduais do complexo dentino-pulpar de dentes de ratos submetidos à luxação extrusiva associada ou não à oclusão traumática* (Tese de doutorado, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”).

RESUMO

Este estudo visa avaliar a influência da oclusão traumática nas alterações teciduais do complexo dentino-pulpar durante o processo de reparo inicial de dentes submetidos à luxação extrusiva. 96 ratos foram divididos em grupos: GC = Controle, GOT= animais submetidos ao método de oclusão traumática. GL = animais submetidos à luxação extrusiva e GLOT = animais submetidos à associação de ambas as injúrias. A indução da luxação extrusiva foi realizada com movimentos de alavanca posicionada na distal da coroa do 1ºMID e a indução da oclusão traumática foi realizada por uma elevação de resina composta do platô oclusal 1ºMSD. Foram feitas análises histomorfométricas do complexo dentino-pulpar do dente envolvido, nos períodos de 7 e 30 dias. Quando comparados ao GC: o GL, apresentou redução da área de matriz extracelular em ambos os períodos ($p=0,001$ e $p=0,0001$), aumento da área de fibras colágenas imaturas aos 30 dias ($p=0,001$), aumento da presença de núcleos nos túbulos dentinários ($p=0,0001$) e descontinuidade da camada de odontoblastos ($p=0,0001$) em ambos os períodos, deposição de dentina reacional ($p=0,0001$), áreas de necrose ($p=0,018$) e inflamação ($p=0,0001$) no período inicial; GOT apresentou diminuição dos vasos sanguíneos em 7 dias ($p=0,038$) além do aumento de perfis nucleares ($p=0,0001$ e $p=0,001$), e deposição de dentina reacional ($p=0,0001$) em ambos os períodos e o GLOT mostrou a presença de núcleos nos túbulos dentinários ($p=0,0001$), descontinuidade da camada de odontoblastos ($p=0,0001$), deposição de dentina reacional ($p=0,0001$) e inflamação ($p=0,0001$) em ambos os períodos, e necrose inicial ($p=0,018$). A oclusão traumática não provocou alterações teciduais significativas em dentes submetidos à luxação extrusiva durante o período estudado, possivelmente devido ao reposicionamento dental, possibilitando um maior ajuste posicional do dente às forças oclusais excessivas.

Palavras-chave: Traumatismos Dentários. Polpa Dentária. Oclusão Dentária Traumática. Doenças da Polpa Dentária.

Debortoli, C. V. L. (2021). *Evaluation of tissue changes in the pulp-dentin complex of rat teeth submitted to extrusive luxation associated or not with traumatic occlusion* (Tese de doutorado, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”).

ABSTRACT

This study aims to evaluate the influence of traumatic occlusion on tissue changes in the pulp-dentin complex during the initial repair process of teeth submitted to extrusive luxation. 96 rats were divided into groups: CG = Control, GOT = animals submitted to the traumatic occlusion method. GL = animals submitted to extrusive luxation and GLOT = animals submitted to the association of both injuries. Induction of extrusive luxation was performed with lever movements positioned distally to the crown of the 1st MID, and induction of traumatic occlusion was performed by a composite resin elevation of the occlusal plateau of the 1st MSD. Histomorphometric analyzes of the dentin-pulpal complex of the involved tooth were performed, in periods of 7 and 30 days. When compared to the CG: the GL, showed a reduction in the extracellular matrix area in both periods ($p=0.001$ and $p=0.0001$), an increase in the area of immature collagen fibers at 30 days ($p=0.001$), an increase in the presence of nuclei in the dentinal tubules ($p=0.0001$) and discontinuity of the odontoblast layer ($p=0.0001$) in both periods, reactive dentin deposition ($p=0.0001$), areas of necrosis ($p=0.018$) and inflammation ($p=0.0001$) in the initial period; GOT showed a decrease in blood vessels in 7 days ($p=0.038$) in addition to an increase in nuclear profiles ($p=0.0001$ and $p=0.001$), and reactive dentin deposition ($p=0.0001$) in both periods and GLOT showed the presence of nuclei in the dentinal tubules ($p=0.0001$), discontinuity of the odontoblast layer ($p=0.0001$), reactive dentin deposition ($p=0.0001$) and inflammation ($p=0.0001$) in both periods, and initial necrosis ($p=0.018$). Traumatic occlusion did not cause significant tissue changes in teeth submitted to extrusive luxation during the study period, possibly due to tooth repositioning, enabling greater positional adjustment of the tooth to excessive occlusal forces.

Keywords: Tooth Injuries. Dental Pulp. Traumatic Dental Occlusion. Dental Pulp Diseases.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Fotomicrografia em microscópio de luz de corte histológico longitudinal do 1ºMID submetido à coloração com HE. Os retângulos mostram o local de captura das imagens e a linha pontilhada determina o limite da polpa coronária para análise.	21
FIGURA 2 -	Fotomicrografias em microscopia de luz de cortes histológicos longitudinais do tecido pulpar coronário do 1ºMID submetidos à técnica de HE. Os espécimes do grupo GL apresentaram menor área de matriz extracelular (e, f), e o grupo GOT mostrou uma presença maior de perfis nucleares em ambos os períodos experimentais (c, d). (VS = Vasos sanguíneos)	26
FIGURA 3 -	Fotomicrografias em microscopias de luz polarizada de cortes histológicos longitudinais do tecido pulpar coronário do 1ºMID submetidos à técnica de PSR. O grupo GL mostrou uma maior porcentagem de fibras colágenas imaturas (verde/amareladas) no período experimental de 30 dias (f).	27
FIGURA 4 -	Fotomicrografias em microscopias de luz de cortes histológicos longitudinais do 1ºMID submetidos à técnica de HE. A extensão da câmara pulpar apresentou-se diminuída no grupo GL no período experimental de 30 dias (f).	28

- FIGURA 5 - Fotomicrografias em microscopia de luz de cortes histológicos longitudinais do complexo dentino-pulpar do 1ºMID submetidos à técnica de HE. Os grupos GOT, GL e GLOT apresentaram núcleos nos túbulos dentinários (pontas das setas) e a presença de dentina reacional (asterisco) em ambos os períodos experimentais (c,d,e,f,g,h). Os grupos GC e GOT mostraram camada de odontoblastos com maior continuidade (linha pontilhada) em relação aos outros grupos (a,b,c,d). (D = Dentina secundária, P = Tecido pulpar). 31
- FIGURA 6 - Fotomicrografias em microscopia de luz de cortes histológicos longitudinais do tecido pulpar coronário do 1ºMID submetidos à técnica de HE. As setas indicam a presença de infiltrado inflamatório nos grupos GOT, GL, GLOT em ambos os períodos experimentais (a,b,c,d,e,f). Áreas de necrose e degeneração tecidual foram encontradas nos grupos GL e GLOT em 7 dias (g, h). 33

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Análise histomorfométrica quantitativa do tecido pulpar dos grupos GC, GOT, GL e GLOT em relação a área de matriz extracelular, área de vasos sanguíneos , área de fibras colágenas maduras e jovens, área da câmara pulpar e perfis nucleares, nos períodos experimentais de 7 e 30 dias. Os dados apresentados são as médias dos animais de cada grupo e período, e entre parênteses o desvio padrão de cada variável em cada grupo e período	25
TABELA 2 -	Análise histomorfométrica semiquantitativa do tecido pulpar dos grupos GC, GOT, GL e GLOT de acordo com o escore adaptado de Massaro, no período experimental de 7 e 30 dias	29
TABELA 3 -	Análise histomorfométrica semiquantitativa da presença e continuidade da camada de odontoblastos e dentina reacional do complexo dentino- pulpar dos grupos GC, GOT, GL e GLOT nos períodos experimentais de 7 e 30 dias	30
TABELA 4 -	Análise histomorfométrica semiquantitativa da presença e intensidade de necrose pulpar e infiltrado inflamatório no tecido pulpar dos grupos GC, GOT, GL e GLOT nos períodos experimentais de 7 e 30 dias	32

LISTA DE SIGLAS

1º MID	Primeiro molar inferior direito
1ºMSD	Primeiro molar superior direito
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GC	Grupo Controle
GL	Grupo Luxação Extrusiva
GLOT	Grupo Luxação Extrusiva + Oclusão traumática
GOT	Grupo Oclusão Traumática
HE	Hematoxilina e eosina
IM	Intramuscular
PBS	Tampão fosfato de sódio
PSR	Picrosirius red
TDA	Traumatismo dentoalveolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	PROPOSIÇÃO	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1	Animais e grupos experimentais	17
3.2	Indução da luxação extrusiva	18
3.3	Indução da oclusão traumática	19
3.4	Perfusão transcardíaca e processamento histológico	19
3.5	Análise histomorfométrica quantitativa	20
3.6	Análise histomorfométrica semiquantitativa	22
3.7	Análise estatística	22
4	RESULTADOS	23
4.1	Avaliação de matriz extracelular, vasos sanguíneos, fibras colágenas maduras e imaturas, câmara pulpar e perfis nucleares nos grupos GC, GOT, GL e GLOT	23
4.2	Avaliação da presença de núcleos nos túbulos dentinários, presença da camada de odontoblastos, deposição de dentina reacional nos grupos GC, GOT, GL e GLOT	24
4.3	Avaliação da presença de necrose pulpar e de infiltrado inflamatório nos grupos GC, GOT, GL e GLOT	24
5	DISCUSSÃO	34
6	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS	39
	ANEXOS	45

1 INTRODUÇÃO*

O traumatismo dentoalveolar (TDA) consiste em um problema de saúde bucal de grande importância e de alta prevalência global (15,2%), que afeta principalmente a faixa jovem da população (média de 13,8 anos) (Petti et al., 2018). Sendo assim, o estudo do diagnóstico dessas lesões, bem como o desenvolvimento de um tratamento ideal das injúrias decorrentes do TDA se tornam necessários para a melhoria dos protocolos de atendimento da alta demanda.

Luxação extrusiva é uma injúria decorrente do TDA, que afeta tanto as estruturas periodontais de suporte, como o complexo dentino-pulpar do dente envolvido. Devido à força e direção do impacto, há o rompimento parcial das fibras do ligamento periodontal e consequentemente o deslocamento parcial do dente para fora do alvéolo no sentido axial. Esse deslocamento pode promover o rompimento ou estiramento do feixe neurovascular apical, promovendo uma perturbação do tecido pulpar (Andreasen et al., 2007; Hermann et al., 2012). O aspecto clínico da luxação extrusiva consiste em um dente visivelmente alongado no sentido axial, com mobilidade excessiva e sangramento advindo do sulco gengival. Os achados radiográficos consistem em um espessamento do espaço do ligamento periodontal na região apical. O tratamento consiste em uma reposição delicada do dente com pressão digital, uso de contenção semi-rígida por duas semanas e o acompanhamento da situação pulpar com testes de vitalidade e exames radiográficos (Bourguignon et al., 2020; Diangelis et al., 2012).

Os danos pulpares frente à luxação extrusiva, resultantes ao distúrbio do suprimento pulpar geralmente estão associados à isquemia e perda do tecido, variando entre uma regeneração tecidual, formação acelerada de dentina, metaplasia pulpar e necrose. A regeneração da polpa está diretamente ligada à revascularização tecidual após o trauma, sendo pouco provável e não esperado em dentes com o desenvolvimento radicular completo (Andreasen & Bakland, 2012; Dumsha & Hovland, 1982).

O reposicionamento do dente no tratamento de luxação extrusiva é uma etapa muito importante para o prognóstico e recuperação dos tecidos lesionados,

* Normas de citação conforme o periódico "Archives of Oral Biology" – ANEXO B

sendo que o reposicionamento incorreto pode promover forças oclusais nocivas aos tecidos periodontais e a polpa. A oclusão disfuncional é chamada de oclusão traumática, que promove um funcionamento inadequado e desarmônico dos tecidos de suporte periodontais e alterações no complexo dentino-pulpar (Brandini et al., 2018; Caviedes-Bucheli et al., 2011; Fan & Caton, 2018). As alterações pulpares frente à oclusão traumática são variáveis de acordo com duração e severidade das forças nocivas e o estado inicial do tecido pulpar, alterando a homeostase tecidual e promovendo edema, angiogenese, aumento da permeabilidade vascular (Caviedes-Bucheli et al., 2017), e do fluxo sanguíneo (Kvinnsland et al., 1989, 1992), produção de dentina reacional, calcificações pulpares, diminuição da câmara pulpar, degeneração de odontoblastos, fibrose tecidual e em casos mais severos a necrose da polpa (Cărmăzaru et al., 2018; Caviedes-Bucheli et al., 2011; Popescu et al., 2011).

O prognóstico do tratamento da luxação extrusiva está diretamente relacionado às respostas pulpares do dente envolvido e ao manejo adequado da condição pulpar. Não existem estudos que avaliem a resposta do complexo dentino-pulpar quando a luxação extrusiva e a oclusão traumática estão associadas. Os possíveis danos causados ao complexo dentino-pulpar dos dentes que sofreram luxação extrusiva devem ser observados de maneira cautelosa, sendo que a existência de uma força oclusal excessiva é um fator de extrema importância que pode influenciar diretamente a homeostase pulpar e consequentemente o prognóstico do dente envolvido.

2 PROPOSIÇÃO

Esse estudo visa avaliar a influência da oclusão traumática nas alterações teciduais do complexo dentino-pulpar durante o processo de reparo inicial de dentes de ratos adulto-jovens submetidos à luxação extrusiva.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e grupos experimentais

Todos os protocolos experimentais foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (UNESP) (Protocolo 466/2018) e estão de acordo com o guia de pesquisa em animais ARRIVE Checklist (Kilkenny et al., 2010).

Foram utilizados 96 ratos, machos, Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando aproximadamente 250g, com 12 semanas de vida, obtidos do Bioterio Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (UNESP). Os animais foram acomodados em gaiolas com fundo em maravalha com, no máximo, três animais cada e alocados no biotério de manutenção do departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, com ambiente controlado em temperatura média de 22°C, umidade relativa em média de 50% e ciclos de claro/escuro de 12h. As gaiolas foram higienizadas e a maravalha repostada em intervalos de dois dias, sempre no período da manhã, até o final dos períodos experimentais.

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos:

- Grupo Controle (GC), n=24: Os animais não foram submetidos a nenhum procedimento experimental afim de comparação dos aspectos de normalidade.
- Grupo Oclusão Traumática (GOT), n=24: Os animais foram submetidos ao protocolo experimental de oclusão traumática.
- Grupo Luxação Extrusiva (GL), n=24: Os animais foram submetidos ao protocolo experimental de luxação extrusiva.
- Grupo Luxação Extrusiva + Oclusão traumática (GLOT), n=24: Os animais foram submetidos aos protocolos de oclusão traumática e luxação extrusiva simultaneamente.

O cálculo do poder da amostra foi realizado por meio do programa G Power (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf - Alemanha), considerando a área de câmara pulpar (μm^2) como variável de desfecho primário e a presença de camada

odontoblástica como variável de desfecho secundário. O cálculo do tamanho da amostra $n = 12$ apresentou poder do estudo de 90%, com nível de significância de 5%. Os períodos experimentais determinados foram de 7 e 30 dias após os procedimentos. Os animais que morreram por causas naturais, tiveram fraturas radiculares ou perderam o dispositivo de indução da OT foram descartados do estudo.

Os procedimentos experimentais descritos e as eutanásias foram realizados sempre no período da manhã, na sala de experimentação animal do departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, com ambiente e equipamentos devidamente higienizados, com bancadas assépticas cobertas com campos de tecido esterilizados. Todo instrumental envolvido nos procedimentos experimentais foram anteriormente lavados e esterilizados.

Para a realização dos procedimentos experimentais, os animais foram previamente anestesiados via intramuscular (IM) com solução de cloridrato de quetamina (80 mg/kg, Vetanarcol, Laboratórios König, Argentina) e xilazina (10 mg/kg, Coopazine, Coopers, São Paulo, Brasil) sendo a dosagem adaptada de acordo com o peso corporal dos animais no dia do experimento. Os animais submetidos aos procedimentos foram dispostos em decúbito dorsal em uma mesa, com membros superiores e inferiores imobilizados e a abertura bucal feita por meio de um dispositivo acoplado a mesa.

3.2 Indução da luxação extrusiva

Para indução da luxação extrusiva, foi selecionado o primeiro molar inferior direito (1ºMID) onde um instrumental hollembach nº 2 (Fava Metalúrgica, São Paulo, Brasil) adaptado foi posicionado na distal do dente realizando movimentos leves de alavanca com força controlada a fim de deslocar o dente no sentido axial. Após a luxação, foi feito um reposicionamento rápido do dente com uma leve pressão digital.

3.3 Indução da oclusão traumática

O método de indução da OT foi baseado em métodos já publicados (Amaral et al., 2017; Kaku et al., 2005; Kawamoto & Nagaoka, 2000; Sodeyama et al., 1996; Wan et al., 2012), onde foi confeccionado um platô elevado de resina composta fotopolimerizável na altura das cúspides oclusais do dente antagonista, o primeiro molar superior direito (1ºMSD). Foram feitas micro retenções em nível de esmalte no sulco principal do dente selecionado com brocas do tipo Carbide ¼ FG (Beavers Dental, Sybron, Morrisburg, Canadá) acoplada em alta rotação com irrigação abundante e posteriormente profilaxia da região com mistura de água e pedra pomes aplicada com escova de Robinson acoplada em contra-ângulo de baixa rotação. O protocolo restaurador consistiu no preparo da superfície com aplicação de ácido fosfórico a 37% no esmalte do dente (FGM, Joinville, Santa Catarina, Brasil) por 30 segundos e em seguida foi feita a lavagem e secagem da superfície para aplicação do sistema adesivo fotopolimerizável Scotchbond Multi-Purpose (3M ESPE, Sant Paul, MN 55144, EUA) com fotopolimerização de 20 segundos. Após aplicação do adesivo, foi aplicado um incremento de resina composta fotopolimerizável Estelite (Tokuyama Dental Corp, Osaka, Japão) na altura das cúspides do dente com um fio de aço de 0,20 milímetros (0,008”) (Morelli, Sorocaba, São Paulo, Brasil) entremeado a resina a fim de reforçar e diminuir o desgaste. O platô confeccionado foi polimerizado por 40 segundos com um fotopolimerizador de luz de led (Kavo, Joinville, Santa Catarina, Brasil).

3.4 Perfusão transcardíaca e processamento histológico

Passados os períodos experimentais de 7 e 30 dias, os animais foram devidamente anestesiados com solução de xilazina e quetamina conforme o peso dos animais no dia e submetidos à eutanásia por perfusão transcardíaca. Com o animal em decúbito dorsal, é feito um acesso no abdome até o coração, onde foi aplicada heparina de forma intraventricular (0,1 ml / 5000 U.I/ml), passados 10 segundos, a artéria aorta do animal foi canulada para perfusão de 200 ml de solução salina a 0,9%, seguida de 400 ml de solução fixadora de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio (PBS) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a 0,1 M,

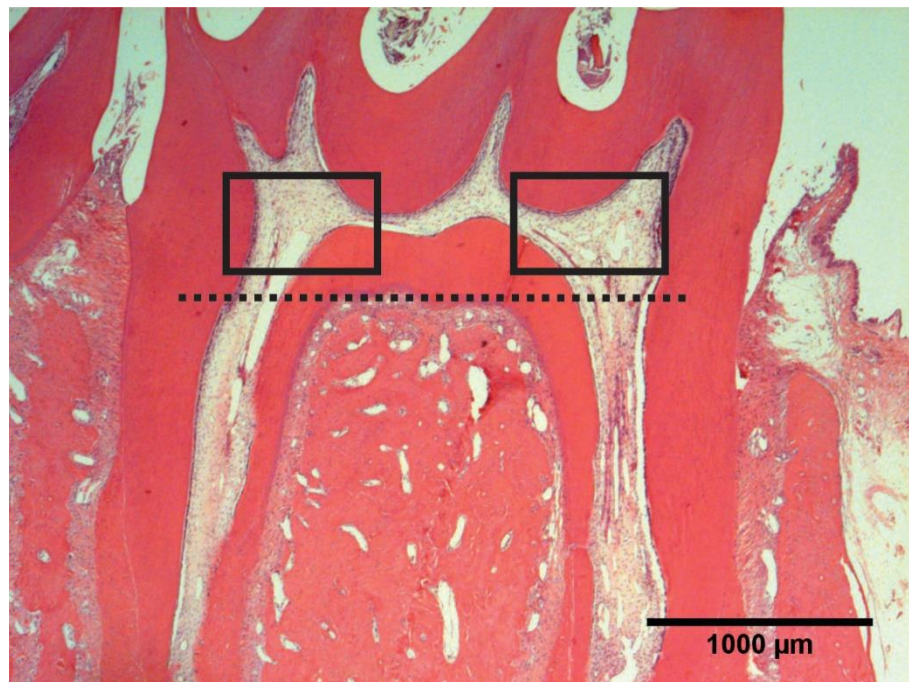
Ph 7,4 a 4°C. Após o processo de perfusão, os animais foram dissecados a fim de coletar as hemimandíbulas direitas contendo o 1ºMID, que foram pós-fixadas na mesma solução fixadora por 24 horas a 4°C. Passado o período, as hemimandíbulas foram lavadas em tampão fosfato (PBS) e submetidas ao processo de descalcificação em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 20% em PBS, durante 40 dias.

Posteriormente as descalcificações, as peças foram desidratadas em soluções com concentrações crescentes de etanol, diafanizadas em soluções de xilol, impregnadas em parafina de baixa temperatura de fusão (56-58°C) e incluídas com orientação padronizada. Com o auxílio de um micrótomo rotativo automático (Leica SMR 2000), foram obtidos cortes histológicos de 4µm de espessura cada, no sentido longitudinal, priorizando a câmara pulpar do 1ºMID. Os cortes foram colocados em banho-maria (40-50°C) e coletados em lâminas histológicas revestidas com poli-L-lisina, sendo que cada lâmina obteve três cortes com uma distância de aproximadamente 32µm entre eles. Uma lâmina de cada animal foi submetida à técnica de coloração hematoxilina-eosina (HE) para análise histomorfométrica em microscopia de luz convencional, e uma lâmina de cada animal submetida à técnica de coloração Picrosirius red (PSR) para análise histomorfométrica em microscopia de luz polarizada.

3.5 Análise histomorfométrica quantitativa

Dos cortes submetidos à técnica de HE, foram capturadas imagens da câmara pulpar em objetiva de 2,5x do primeiro corte de cada animal e imagens da polpa na região mesial e distal da câmara pulpar em objetiva de 40x de todos os cortes da lâmina com o auxílio de um microscópio (Aristoplan, Leica Microsystems Wetzlar, Alemanha) acoplado a uma câmera digital AxioCam MRc (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Alemanha), utilizando o software Axiovision Rel 4.0 (Carl Zeiss, GmbH, Alemanha). Os cortes submetidos a técnica de PR tiveram a captura de imagem da região mesial e distal da câmara pulpar com objetiva de 40x em microscópio de luz polarizada (DM4000B; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha).

FIGURA 1 – Fotomicrografia em microscópio de luz de corte histológico longitudinal do 1ºMID submetido à coloração com HE. Os retângulos mostram o local de captura das imagens e a linha pontilhada determina o limite da polpa coronária para análise



Fonte: Elaborada pelo Autor (2021)

As imagens obtidas em HE da câmara pulpar em menor aumento foram utilizadas para análise histomorfométrica da área da câmara pulpar. As imagens da polpa em HE na porção mesial e distal da câmara pulpar foram utilizadas para a quantificação da porcentagem de área de matriz extracelular, área de vasos sanguíneos além da contagem de perfis nucleares, excluindo células da camada de odontoblastos, células endoteliais, células de feixes nervosos e células inflamatórias. As análises foram feitas com o auxílio do software Image J (National Institutes of Health, EUA), quantificando através da seleção das áreas por contraste e contagem de células pela ferramenta “multi-point” do próprio programa.

As imagens obtidas em PSR foram utilizadas para quantificar a porcentagem de área de fibras colágenas para a avaliação da maturidade das fibras colágenas presentes no tecido pulpar, sendo que as fibras vermelhas e alaranjadas foram consideradas maduras e as fibras verdes e amareladas imaturas (Cintra et al., 2017; Junqueira et al., 1982). Foi utilizado o programa LAS 4.12 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) que permitiu a seleção das cores de cada tipo de fibra, através de valores já estabelecidos de matriz, saturação e brilho para cada tipo

de fibra (Zerbinati & Calligaro, 2018). Toda a análise histomorfométrica quantitativa foi feita por uma única pessoa treinada e previamente calibrada.

3.6 Análise histomorfométrica semiquantitativa

As análises das alterações do tecido pulpar foram feitas em toda extensão da câmara pulpar dos cortes em HE, por uma única pessoa devidamente treinada e calibrada. Foi utilizada uma adaptação do método proposto por Massaro et. al. (Massaro et al., 2009), observando a presença ou ausência de hialinização pulpar, nódulos pulpares, calcificação difusa, congestão vascular, hemorragia, trombose e a presença de núcleos celulares nos túbulos dentinários. Outro método foi empregado para a análise de fatores como a camada de odontoblastos, deposição de dentina reacional, necrose pulpar e infiltrado inflamatório, classificando-os como: ausente, presente em uma área restrita, parcialmente presente e totalmente presente (Nishioka et al., 1998).

3.7 Análise estatística

Após a coleta, os dados foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov para análise da normalidade e homogeneidade. Para comparação dos grupos, foi utilizado o Graph Pad Prisma 8.0 (GraphPad Softwares Incorporated, San Diego, EUA), com a aplicação do teste de Kruskal-Wallis em combinação com o teste post-hoc de Dunn com nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

Algumas das amostras foram perdidas no estudo, sendo que três animais morreram por causas naturais (GC=1 e GOT=2), três perderam o dispositivo de indução da OT (GOT=2 e GLOT=1), um animal teve fraturas radiculares constatadas (GL=1) e oito espécimes foram danificados durante o processamento histológico (GC=4 e GL=4). Todos os animais estavam dentro da faixa de peso médio sem a presença de lesões ou abscessos.

Os dados referentes à análise histomorfométrica quantitativa estão dispostos na Tabela 1. A análise histomorfométrica semiquantitativa está apresentada nas Tabelas 2,3 e 4. Não houve alterações quanto à hialinização pulpar, nódulos pulpares e trombose entre os grupos em ambos os períodos de estudo abordados, com todos os animais recebendo o mesmo escore (1 = ausente).

Existem diferentes mudanças histomorfométricas no complexo dentino-pulpar perante a luxação extrusiva e a oclusão traumática, associadas ou não, quando comparadas as condições de normalidade. Os resultados são descritos a seguir.

4.1 Avaliação de matriz extracelular, vasos sanguíneos, fibras colágenas maduras e imaturas, câmara pulpar e perfis nucleares nos grupos GC, GOT, GL e GLOT

No GL há uma diminuição significativa de matriz extracelular em 7 dias ($p=0,001$) que se mantém em 30 dias ($p=0,0001$) e essa diminuição também acontece no grupo GLOT quando comparado aos grupos controle e oclusão traumática. Em GOT houve uma diminuição significativa da área de vasos sanguíneos em 7 dias ($p=0,038$), condição que não se repete em 30 dias quando comparados ao GC. Há um aumento significativo da expressão de fibras colágenas imaturas no GL apenas em 30 dias ($p=0,001$), e também uma diminuição significativa da câmara pulpar ($p=0,003$) no mesmo grupo e período em relação aos outros grupos. O GOT mostrou um aumento significativo do número de perfis

nucleares em 7 dias ($p=0,0001$) que persistiu em 30 dias ($p=0,001$) quando comparado ao GC.

4.2 Avaliação da presença de núcleos nos túbulos dentinários, presença da camada de odontoblastos, deposição de dentina reacional nos grupos GC, GOT, GL e GLOT

Em GLOT nota-se a presença significativa de núcleos nos túbulos dentinários em 7 dias ($p=0,0001$), que se mantem em 30 dias ($p=0,0001$), quadro também presente no grupo GL tanto em 7 dias ($p=0,0001$) quanto em 30 dias ($p=0,0001$) quando comparados ao GC. Quanto à presença da camada de odontoblastos, é possível observar redução significativa em GL e GLOT em ambos os períodos experimentais ($p=0,0001$) em relação ao GC. A deposição de dentina reacional é aumentada significativamente nos grupos GOT, GL e GLOT em ambos os períodos experimentais ($p=0,0001$) quando comparados ao GC.

4.3 Avaliação da presença de necrose pulpar e de infiltrado inflamatório nos grupos GOT, GL e GLOT

Em GL e GLOT há presença parcial e restrita de áreas de tecido necrosado em 7 dias ($p=0,018$) o que não acontece em 30 dias. O infiltrado inflamatório se fez presente significativamente nos grupos GOT, GL e GLOT em 7 dias ($p=0,0001$) e regrediu significativamente apenas em GOT em 30 dias ($p=0,0001$) em comparação ao GC.

TABELA 1 - Análise histomorfométrica quantitativa do tecido pulpar dos grupos GC, GOT, GL e GLOT em relação a área de matriz extracelular, área de vasos sanguíneos, área de fibras colágenas maduras e jovens, área da câmara pulpar e perfis nucleares, nos períodos experimentais de 7 e 30 dias. Os dados apresentados são as médias dos animais de cada grupo e período, e entre parênteses o desvio padrão de cada variável em cada grupo e período

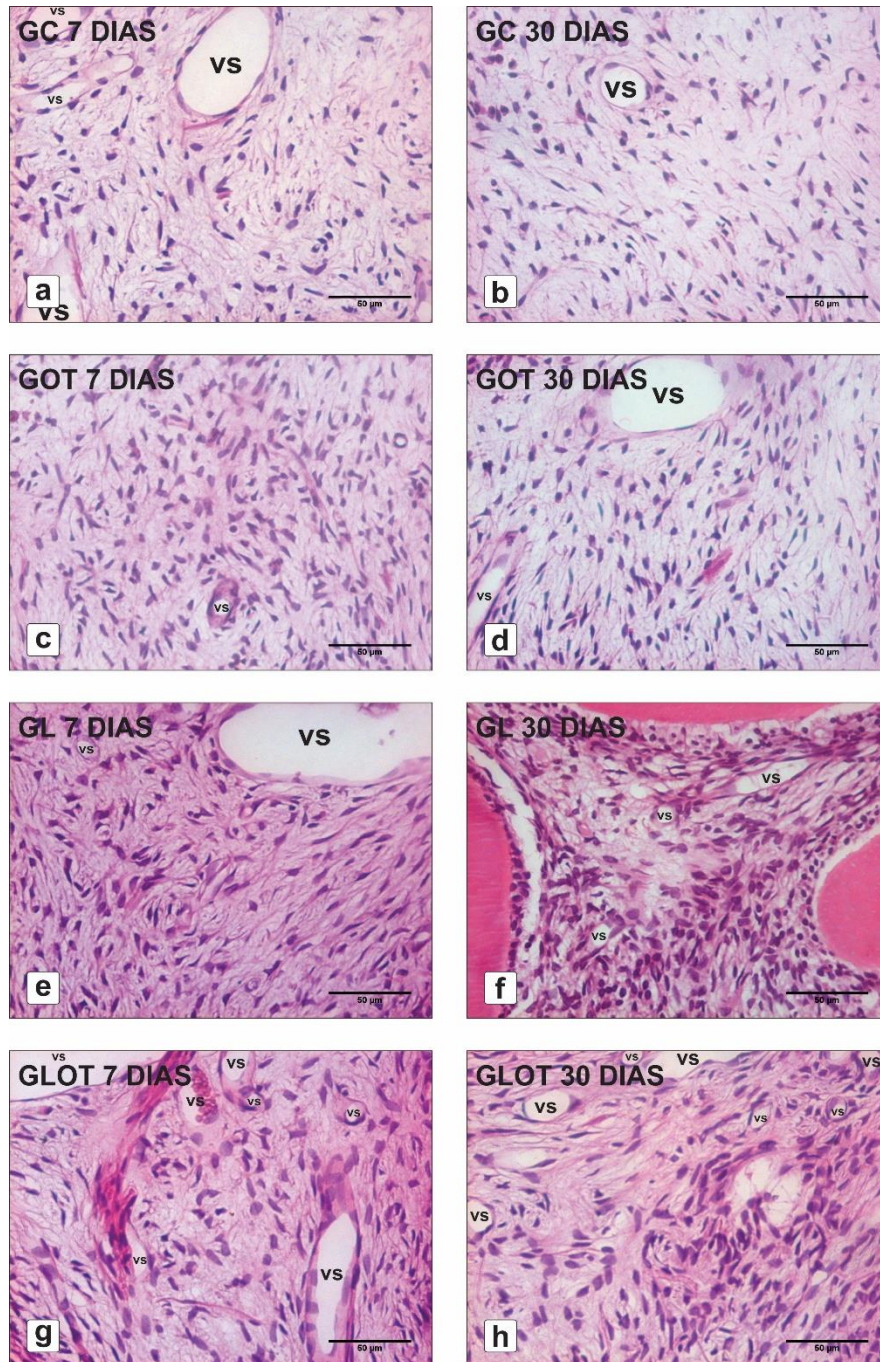
Variáveis	Períodos									
	7 dias					30 dias				
	GC	GOT	GL	GLOT	Valor P	GC	GOT	GL	GLOT	Valor P
Área de matriz extracelular (%)	51,53 (5,05)a	58,34 (5,63)a,b	38,74 (12,00)b	45,67 (10,74)a,b	0,001*	62,43 (5,23)a	62,60 (4,68)a	46,68 (16,20)b	42,61 (8,11)b	0,0001*
Área de vasos sanguíneos (%)	6,22 (3,61)a	4,50 (3,44)b	8,73 (4,67)a	9,16 (5,71)a	0,038*	4,14 (1,50)a	3,84 (2,07)a	5,63 (3,83)a	6,56 (4,17)a	0,324
Área de fibras colágenas maduras (%)	13,29 (8,28)a	13,84 (9,64)a	9,87 (7,43)a	6,21 (3,93)a	0,188	7,49 (6,21)a	12,29 (6,16)a	9,31 (8,61)a	3,87 (2,39)a	0,055
Área de fibras colágenas imaturas (%)	3,03 (2,19)a	1,57 (0,86)a	1,42 (0,82)a	3,12 (2,80)a	0,078	2,13 (1,54)a	12,31 (36,74)a	4,93 (6,89)b	0,48 (0,44)a	0,001*
Área de câmara pulpar (μm^2)	779607,00 (92024,94)a	782657,14 (119939,91)a	758816,33 (198265,01)a	847669,39 (160454,27)a	0,572	849579,80 (226521,50)a	704644,90 (192336,18)a	477652,04 (134207,37)b	714070,75 (134878,91)a	0,003*
Perfis nucleares	209,10 (31,21)a	285,38 (41,17)b	212,56 (27,94)a	153,01 (69,62)a	0,0001**	181,48 (26,13)a	265,88 (39,06)b	193,53 (49,02)a	219,37 (51,19)a	0,001*

* p<0,05 **p<0,01 (Teste de Kruskal-Wallis de Amostras Independentes)

Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos em cada evento.

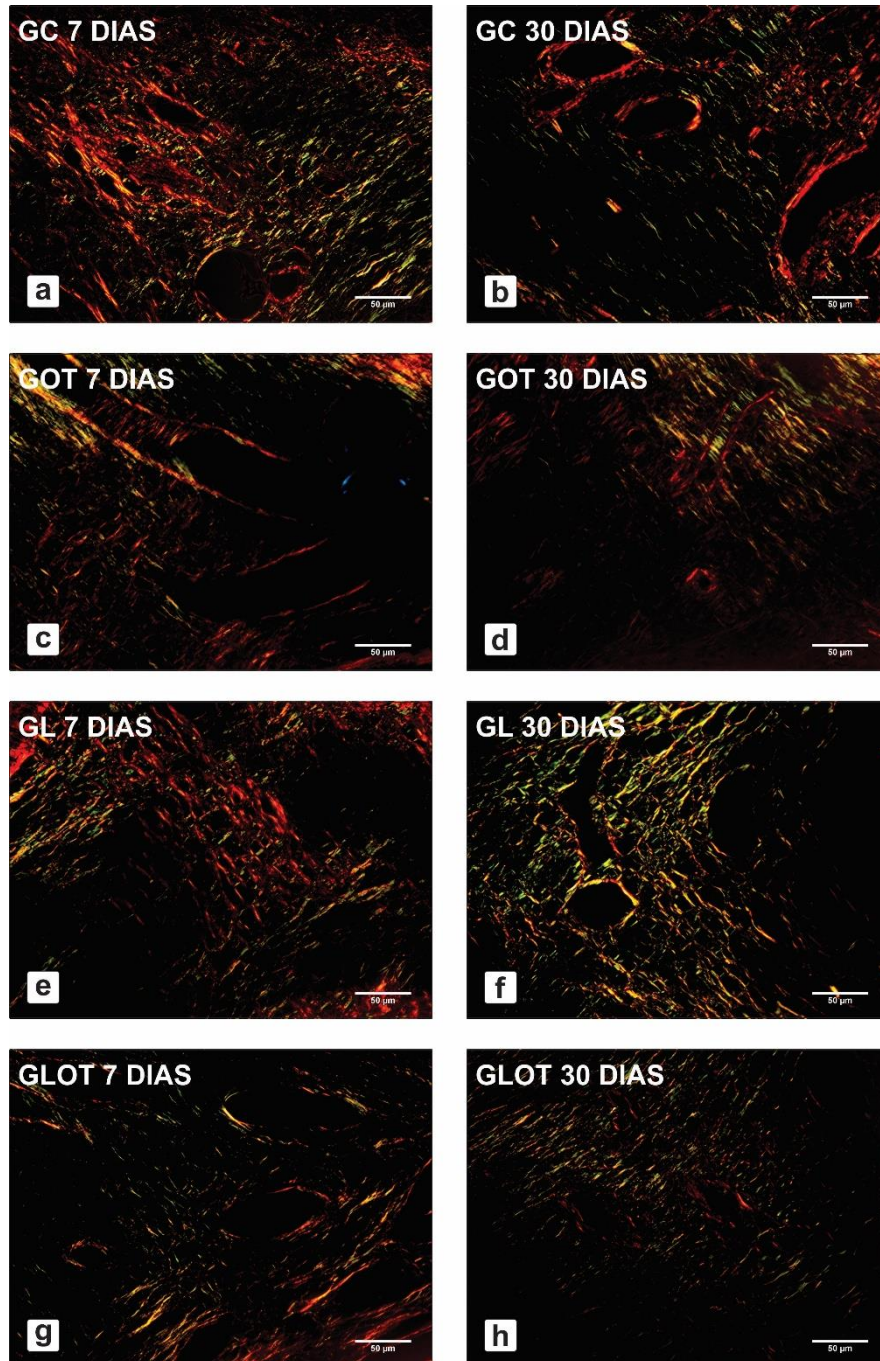
Fonte: Elaborada pelo autor (2021)

FIGURA 2 – Fotomicrografias em microscopia de luz de cortes histológicos longitudinais do tecido pulpar coronário do 1ºMID submetidos à técnica de HE. Os espécimes do grupo GL apresentaram menor área de matriz extracelular (e, f), e o grupo GOT mostrou uma presença maior de perfis nucleares em ambos os períodos experimentais (c, d). (VS = Vasos sanguíneos)



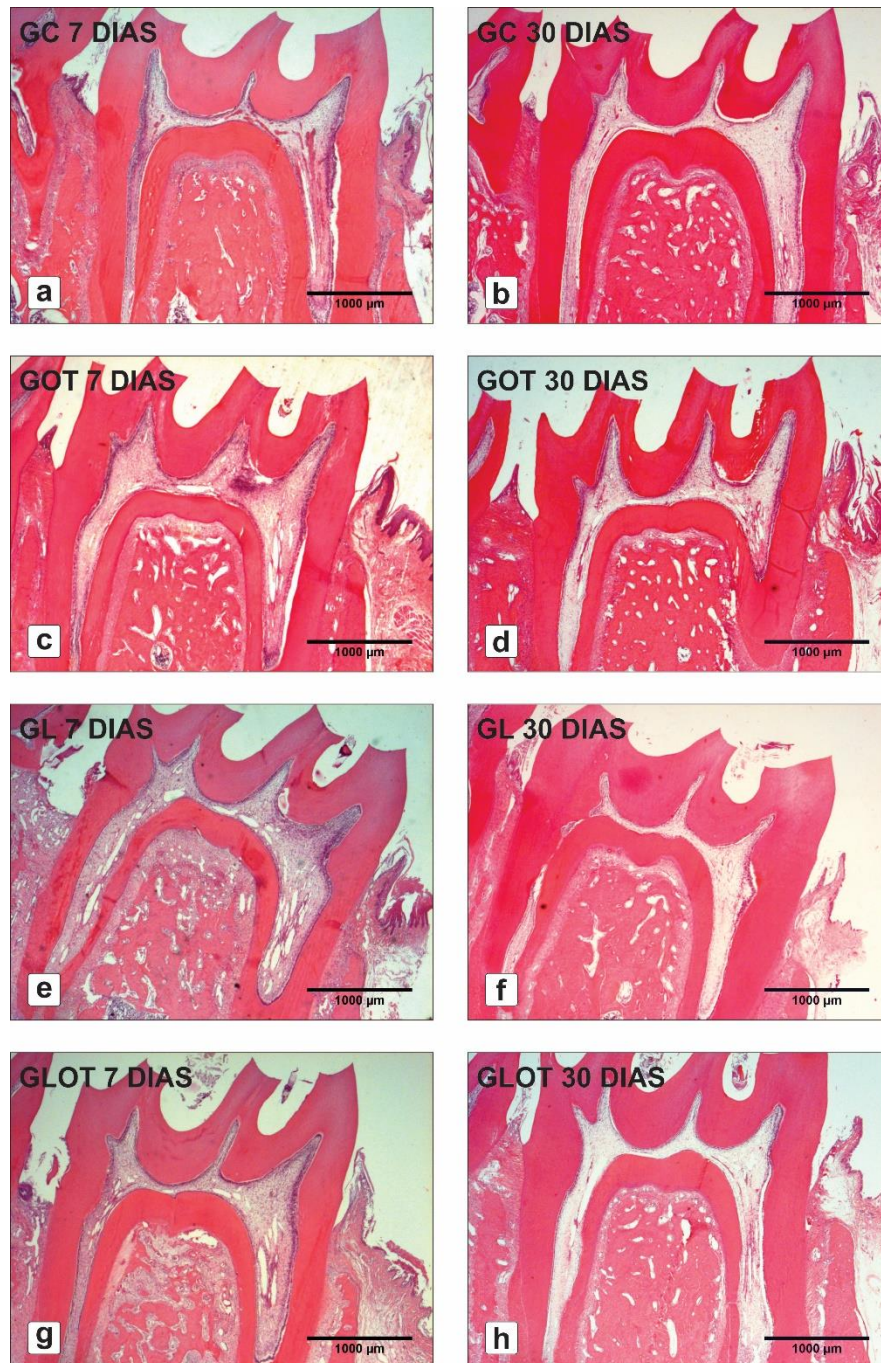
Fonte: Elaborada pelo Autor (2021)

FIGURA 3 – Fotomicrografias em microscopias de luz polarizada de cortes histológicos longitudinais do tecido pulpar coronário do 1ºMID submetidos à técnica de PSR. O grupo GL mostrou uma maior porcentagem de fibras colágenas imaturas (verde/amareladas) no período experimental de 30 dias (f)



Fonte: Elaborada pelo Autor (2021)

FIGURA 4 – Fotomicrografias em microscopias de luz de cortes histológicos longitudinais do 1ºMID submetidos à técnica de HE. A extensão da câmara pulpar apresentou-se diminuída no grupo GL no período experimental de 30 dias (f)



Fonte: Elaborada pelo Autor (2021)

TABELA 2 – Análise histomorfométrica semiquantitativa do tecido pulpar dos grupos GC, GOT, GL e GLOT de acordo com o escore adaptado de Massaro et. al; no período experimental de 7 e 30 dias

	Períodos									
	7 dias					30 dias				
	GC	GOT	GL	GLOT	Valor P	GC	GOT	GL	GLOT	Valor P
	Presença	Presença	Presença	Presença		Presença	Presença	Presença	Presença	
Hialinização pulpar	0/9 _a	0/10 _a	0/9 _a	0/11 _a	N	0/10 _a	0/10 _a	0/10 _a	0/12 _a	N
Nódulos pulpares	0/9 _a	0/10 _a	0/9 _a	0/11 _a	N	0/10 _a	0/10 _a	0/10 _a	0/12 _a	N
Calcificação difusa	1/9 _a	0/10 _a	1/9 _a	1/11 _a	0,763	0/10 _a	1/10 _a	0/10 _a	1/12 _a	N
Congestão vascular	0/9 _a	1/10 _a	0/9 _a	0/11 _a	0,395	0/10 _a	0/10 _a	0/10 _a	0/12 _a	N
Hemorragia	1/9 _a	0/10 _a	0/9 _a	0/11 _a	0,331	0/10 _a	0/10 _a	0/10 _a	0/12 _a	N
Trombose	0/9 _a	0/10 _a	0/9 _a	0/11 _a	N	0/10 _a	0/10 _a	0/10 _a	0/12 _a	N
Núcleos nos túbulos dentinários	0/9 _a	4/10 _a	5/9 _{a,b}	11/11 _b	0,0001**	1/10 _a	3/10 _a	10/10 _b	12/12 _b	0,0001

* p<0,05 **p<0,01 (Teste de Kruskal-Wallis de Amostras Independentes)

Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos em cada evento.

N = Nenhuma estatística foi calculada pois a variável é uma constante,

Fonte: Elaborada pelo autor (2021)

TABELA 3 – Análise histomorfométrica semiquantitativa da presença e continuidade da camada de odontoblastos e dentina reacional do complexo dentino- pulpar dos grupos GC, GOT, GL e GLOT nos períodos experimentais de 7 e 30 dias

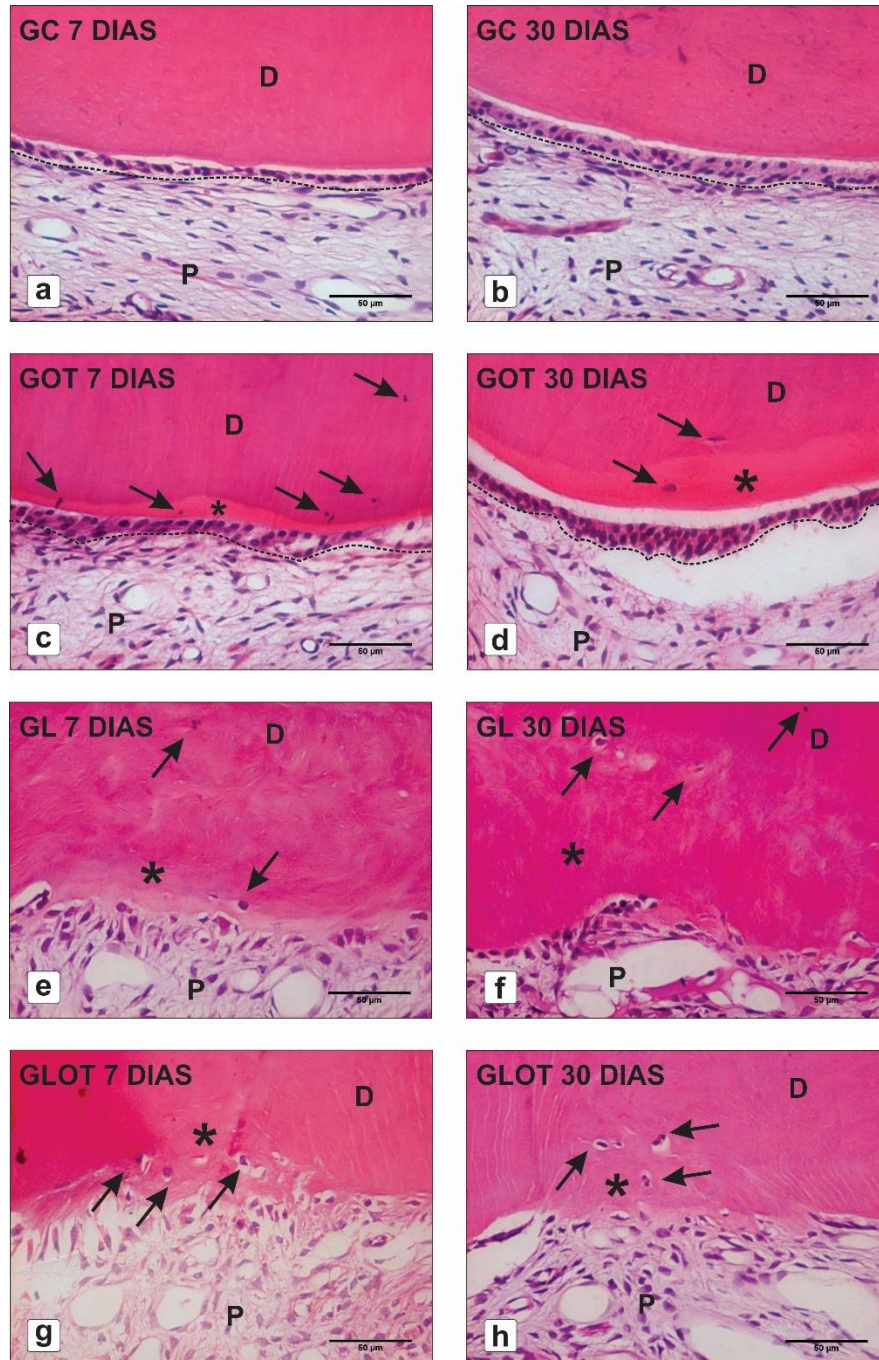
	Períodos															
	7 dias								30 dias							
	Camada de odontoblastos				Dentina reacional				Camada de odontoblastos				Dentina reacional			
Escores	GC	GOT	GL	GLOT	GC	GOT	GL	GLOT	GC	GOT	GL	GLOT	GC	GOT	GL	GLOT
Ausente	0/9 _a	0/10 _a	0/9 _a	0/11 _a	8/9 _a	0/10 _b	3/9 _{a,b}	0/11 _b	0/10 _a	0/10 _a	0/10 _a	0/12 _a	10/10 _a	0/10 _b	0/10 _b	0/12 _b
Presente em área restrita	0/9 _a	0/10 _a	0/9 _a	0/11 _a	1/9 _{a,b}	0/10 _b	5/9 _{a,c}	9/11 _c	0/10 _a	0/10 _a	1/10 _a	0/12 _a	0/10 _a	2/10 _a	2/10 _a	10/12 _b
Parcialmente presente	0/9 _a	0/10 _a	6/9 _b	7/11 _b	0/9 _a	8/10 _b	1/9 _a	2/11 _a	1/10 _a	3/10 _{a,b}	8/10 _b	10/12 _b	0/10 _a	8/10 _b	6/10 _{b,c}	2/12 _{a,c}
Totalmente presente	9/9 _a	10/10 _a	3/9 _b	4/11 _b	0/9 _a	2/10 _a	0/9 _a	0/11 _a	9/10 _a	7/10 _{a,b}	1/10 _c	2/12 _{b,c}	0/10 _a	0/10 _a	2/10 _a	0/12 _a
	0,0001**				0,0001**				0,0001**				0,005*			

* p<0,05 **p<0,01 (Teste de Kruskal-Wallis de Amostras Independentes)

Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos em cada evento.

Fonte: Elaborada pelo autor (2021)

FIGURA 5 – Fotomicrografias em microscopia de luz de cortes histológicos longitudinais do complexo dentino-pulpar do 1ºMID submetidos à técnica de HE. Os grupos GOT, GL e GLOT apresentaram núcleos nos túbulos dentinários (pontas das setas) e a presença de dentina reacional (asterisco) em ambos os períodos experimentais (c,d,e,f,g,h). Os grupos GC e GOT mostraram camada de odontoblastos com maior continuidade (linha pontilhada) em relação aos outros grupos (a,b,c,d). (D = Dentina secundária, P = Tecido pulpar)



Fonte: Elaborada pelo Autor (2021)

TABELA 4 – Análise histomorfométrica semiquantitativa da presença e intensidade de necrose pulpar e infiltrado inflamatório no tecido pulpar dos grupos GC, GOT, GL e GLOT nos períodos experimentais de 7 e 30 dias

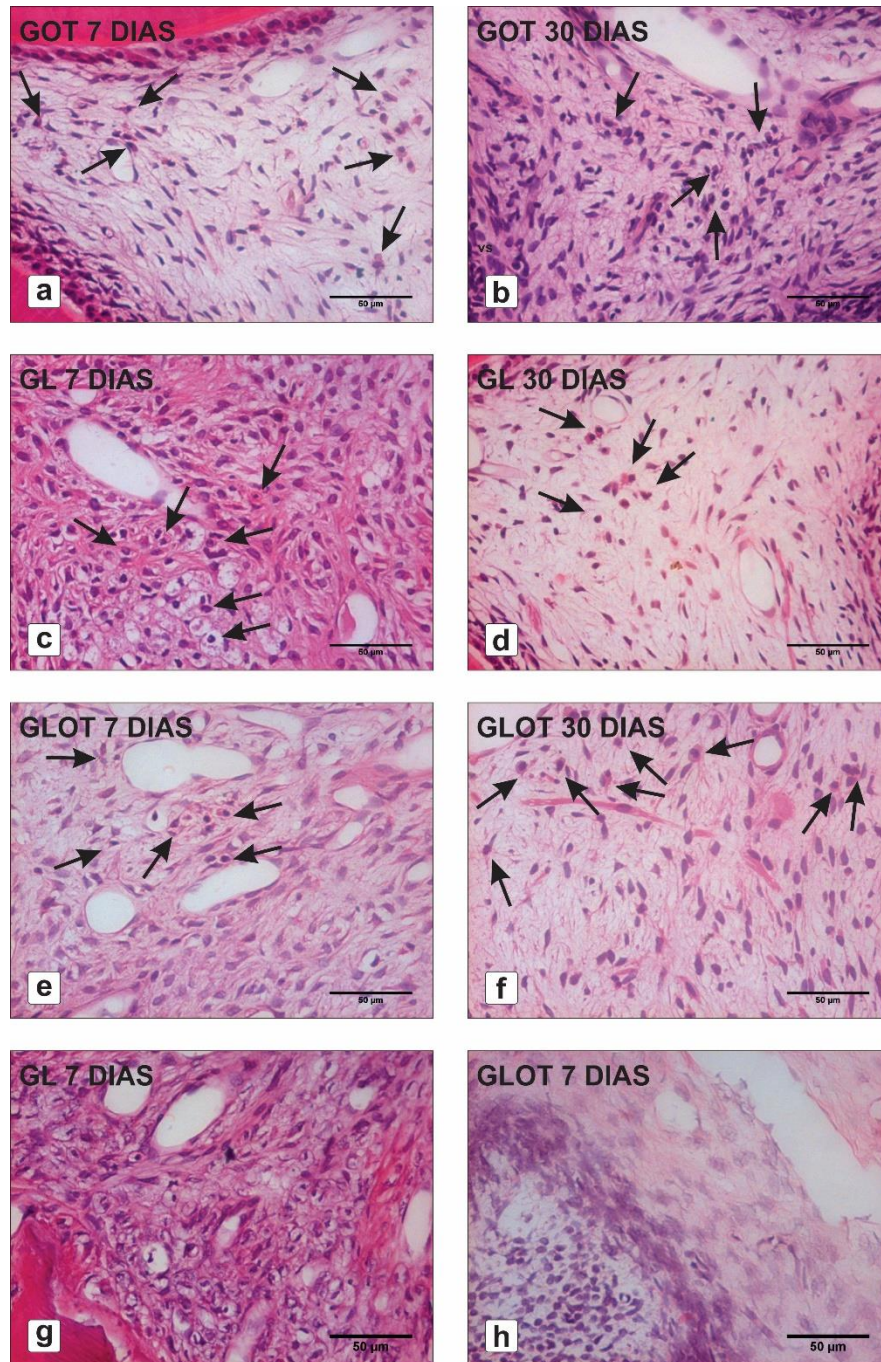
	Períodos															
	7 dias								30 dias							
	Necrose pulpar				Infiltrado inflamatório				Necrose pulpar				Infiltrado inflamatório			
Escores	GC	GOT	GL	GLOT	GC	GOT	GL	GLOT	GC	GOT	GL	GLOT	GC	GOT	GL	GLOT
Ausente	9/9 _a	10/10 _a	6/9 _a	7/11 _a	9/9 _a	1/10 _b	0/9 _a	0/11 _b	10/10 _a	10/10 _a	10/10 _a	12/12 _a	9/10 _a	7/10 _{a,b}	0/10 _c	2/12 _{b,c}
Presente em área restrita	0/9 _a	0/10 _a	2/9 _a	3/11 _a	0/9 _a	5/10 _{a,b}	3/9 _{a,b}	6/11 _b	0/10 _a	0/10 _a	0/10 _a	0/12 _a	1/10 _a	2/10 _a	4/10 _a	6/12 _a
Parcialmente presente	0/9 _a	0/10 _a	1/9 _a	1/11 _a	0/9 _a	4/10 _{a,b}	6/9 _b	5/11 _{a,b}	0/10 _a	0/10 _a	0/10 _a	0/12 _a	0/10 _a	1/10 _a	5/10 _a	4/12 _a
Totalmente presente	0/9 _a	0/10 _a	0/9 _a	0/11 _a	0/9 _a	0/10 _a	0/9 _a	0/11 _a	0/10 _a	0/10 _a	0/10 _a	0/12 _a	0/10 _a	0/10 _a	1/10 _a	0/12 _a
Valor P	0,018*				0,0001**				N				0,0001**			

* p<0,05 **p<0,01 (Teste de Kruskal-Wallis de Amostras Independentes)

Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos em cada evento.

Fonte: Elaborada pelo autor (2021)

FIGURA 6 – Fotomicrografias em microscopia de luz de cortes histológicos longitudinais do tecido pulpar coronário do 1ºMID submetidos à técnica de HE. As setas indicam a presença de infiltrado inflamatório nos grupos GOT, GL, GLOT em ambos os períodos experimentais (a,b,c,d,e,f). Áreas de necrose e degeneração tecidual foram encontradas nos grupos GL e GLOT em 7 dias (g, h)



Fonte: Elaborada pelo Autor (2021)

5 DISCUSSÃO

Este estudo foi desenvolvido com o intuito de avaliar as alterações histomorfométricas no complexo dentino-pulpar de molares de ratos submetidos à luxação extrusiva, oclusão traumática e associação de ambas. Todos os dados observados mostram uma alteração da homeostase do tecido aos 7 e 30 dias.

O modelo de experimentação em ratos é amplamente utilizado em estudos envolvendo luxação extrusiva (Queiroz et al., 2019; Santana et al., 2017; Shibue et al., 1998) e oclusão traumática (Amaral et al., 2017; Kaku et al., 2005; Kawamoto & Nagaoka, 2000; Sodeyama et al., 1996; Wan et al., 2012), devido a vantagens de custo, manutenção e acomodação, além das dificuldades éticas da condução desse tipo de estudo em humanos. A escolha do 1ºMID como o dente a ser analisado é devida a interação oclusal com o seu antagonista (1ºMSD), onde o platô oclusal foi confeccionado, evitando qualquer interferência proveniente do preparo da superfície e das substâncias envolvidas na confecção da restauração direta em resina composta nos tecidos analisados. A luxação realizada no 1ºMID possui muitas dificuldades técnicas de padronização devido à variação de tamanho, posição e fragilidade do dente, sendo mantido um padrão visual de exposição radicular e mobilidade, sem remover o dente do alvéolo, simulando as condições clínicas de uma luxação extrusiva.

As alterações do complexo dentino-pulpar em resposta a forças oclusais excessivas estão ligadas ao processo de inflamação tecidual (Popescu et al., 2011) de origem neurogênica (Caviedes-Bucheli et al., 2011; Killough et al., 2009; Kvinnsland et al., 1992). No presente estudo, os animais que foram submetidos à oclusão traumática associada ou não a luxação extrusiva, apresentaram infiltrado inflamatório no tecido pulpar no período inicial. O estímulo mecânico promovido pela oclusão traumática promove uma movimentação anormal do fluido dos túbulos dentinários, transmitindo estímulos a nociceptores presentes na matriz extracelular do tecido pulpar (Caviedes-Bucheli et al., 2011; Rees, 2002). Os nociceptores pulpares são responsáveis pela liberação de substância P (SP) que está envolvida na proliferação de odontoblastos e nos processos inflamatórios e necrose da polpa, sendo que, quanto maior o estímulo mecânico envolvido, maior a quantidade de SP e consequentemente maiores níveis de inflamação do tecido pulpar (Cărmăzaru et

al., 2018; Caviedes-Bucheli et al., 2011, 2017; Kvinnsland et al., 1992). Os dois estímulos mostraram-se capazes de gerar quadros inflamatórios leves na polpa coronária, sendo que a luxação extrusiva aparenta manter o quadro inflamatório por mais tempo. Contudo, a ausência dos fatores indicadores de degeneração da polpa evidencia que os estímulos aplicados pelo modelo de estudo não foram capazes de causar danos teciduais maiores.

Este estudo mostrou que em animais submetidos apenas a oclusão traumática houve um aumento no número de perfis nucleares em ambos os períodos, porém uma diminuição dos níveis de inflamação em longo prazo em comparação com animais que sofreram luxação extrusiva ou oclusão traumática associada à luxação extrusiva, além de que não houve necrose quando apenas a oclusão traumática está envolvida, no período estudado. A oclusão traumática promove um reposicionamento dentário devido à remodelação do periodonto de sustentação quando submetido a forças oclusais excessivas em longo prazo, o que pode resultar na diminuição da intensidade das forças oclusais (Clark et al., 1999; Nakatsu et al., 2014; Yoshinaga et al., 2007), diminuindo os danos causados na polpa. A ausência de áreas de necrose em animais submetidos à oclusão traumática sugere que o modelo experimental de indução adotado não promove estímulo suficiente para promover necrose tecidual na polpa. Os animais submetidos apenas à oclusão traumática apresentaram diminuição da luz dos vasos sanguíneos presentes na câmara pulpar em um período inicial em relação aos outros grupos o que pode estar relacionado à compressão tecidual inicial em animais que possuem inserção periodontal não prejudicada pela luxação extrusiva frente à oclusão traumática.

Resultados mostram que a produção de dentina reacional está relacionada à oclusão traumática, porém, sem alteração das dimensões da câmara pulpar. O estímulo nocivo da oclusão traumática promove uma situação de estresse nos tecidos pulpares, aumentando os níveis de atividade celular, produzindo fatores de proteção, semelhante ao que acontece em lesões cáries, movimentações ortodônticas e preparos cavitários (Caviedes-Bucheli et al., 2011). Sendo assim, a formação de dentina reacional tanto no período inicial quanto em longo prazo deve ser considerada como uma resposta protetora do complexo dentino-pulpar as forças mecânicas excessivas.

Os danos pulparez promovidos pela luxação extrusiva geralmente estão relacionados com o rompimento ou estiramento do feixe neurovascular consequente da movimentação dentária que ocorre durante o trauma (Andreasen et al., 2007; Hermann et al., 2012). No presente estudo, os animais que foram submetidos apenas a luxação extrusiva mostraram uma grande formação de dentina reacional, de maneira desorganizada pela extensão da câmara pulpar, diminuindo significativamente sua extensão. Essa dentina foi formada de maneira rápida pela camada de odontoblastos, incorporando algumas células na matriz mineralizada, o que pode explicar a descontinuidade da camada de odontoblastos e o aparecimento de núcleos nos túbulos dentinários nesses casos. O processo de formação descontrolada de dentina reacional após um traumatismo é denominado de metamorfose calcificada da polpa ou obliteração do canal pulpar (Queiroz et al., 2019; Spinaz et al., 2021), um achado comum em lesões de deslocamento com pouco comprometimento pulpar (Andreasen et al., 1987; Andreasen & Bakland, 2012). A produção da dentina reacional na luxação extrusiva é um processo fisiológico resultante de um estímulo estressante aos fibroblastos do tecido pulpar devido à hipóxia no tecido, sendo que, falta de oxigênio causado pela interrupção do aporte sanguíneo pode desencadear liberações de fatores de crescimento e diferenciação celular, ocorrendo o desenvolvimento de novos odontoblastos e a produção de dentina (Matsushita et al., 2000; Queiroz et al., 2019; Vanacker et al., 2014). A presença de núcleos nos túbulos dentinários, principalmente na associação da luxação extrusiva e oclusão traumática, indica um maior estresse do complexo dentino-pulpar, sendo que na presença somente de luxação extrusiva é necessário um maior período de tempo para que isso ocorra.

Outro fator que se mostra fortemente relacionado à formação de tecido calcificado é a regeneração incompleta dos feixes nervosos na polpa (Andreasen & Bakland, 2012). A produção de dentina reacional observada na luxação extrusiva se comporta de maneira diferente da oclusão traumática e até mesmo quando associada à oclusão traumática. A diminuição das dimensões da câmara pulpar é um fenômeno observado apenas nos animais submetidos a luxação extrusiva, o que nos leva a considerar que a produção de dentina reacional na luxação extrusiva isolada é maior, porém menos distribuída pelas paredes da câmara pulpar, sendo que a diminuição da câmara pulpar, por sua vez pode estar associada a uma

acomodação mais próximas das células do tecido pulpar, diminuindo o espaço para matriz extracelular.

Este estudo evidencia que luxação extrusiva, quando não associada à oclusão traumática, apresenta um maior percentual de fibras colágenas imaturas no período tardio, indicando um possível atraso na recuperação tecidual, uma vez que fibras imaturas dão lugar a fibras colágenas maduras no processo de reparo (Zerbinati & Calligaro, 2018). A recuperação da polpa em casos de luxação extrusiva está intimamente ligada ao reestabelecimento do aporte sanguíneo e nervoso do tecido, essa condição varia de acordo com o desenvolvimento radicular do dente e o diâmetro do forame apical (Andreasen et al., 1986; Andreasen & Pedersen, 1985), sendo que em dentes maduros, o processo se torna difícil (Andreasen, 2012). Pequenas áreas necróticas foram encontradas na polpa de poucos animais submetidos à luxação extrusiva, associada ou não a oclusão traumática apenas no período inicial, indicando danos iniciais provocados por uma isquemia pulpar e que o tecido se reestabeleceu num período tardio, com atraso nos animais com luxação extrusiva apenas, provavelmente porque neste modelo a revascularização da polpa é dificultada pelo grau de amadurecimento dentário, com forames reduzidos. Este atraso pode se justificar pela ausência de estabilidade do dente luxado, uma vez que os protocolos experimentais adotados não preconizam a contenção do dente, sendo que no grupo em que a luxação extrusiva esteve associada com a oclusão traumática, as forças oclusais excessivas no sentido axial promovem uma estabilidade dentária maior, facilitando o reparo tecidual.

De acordo com o modelo de estudo proposto, a associação da luxação extrusiva com oclusão traumática nos permitiu observar a interação dos estímulos no complexo dentino-pulpar, apresentando características semelhantes aos animais submetidos exclusivamente a luxação extrusiva e oclusão traumática. A presença de núcleos nos túbulos dentinários, a distribuição de dentina reacionária e do infiltrado inflamatório, além da alteração na camada de odontoblastos observadas nos animais submetidos à associação das duas injúrias foram semelhantes aos dados encontrados nos animais submetidos exclusivamente a luxação extrusiva, ao mesmo tempo em que a manutenção do espaço da câmara pulpar e a recuperação não atrasada do tecido pulpar mostram semelhança com o observado na oclusão traumática.

6 CONCLUSÃO

A oclusão traumática, embora tenha intensificado a resposta de defesa da polpa, não provocou alterações teciduais do complexo dentino-pulpar significativas em dentes submetidos à luxação extrusiva durante o período estudado. Isto pode ser justificado, pelo possível ajuste posicional do dente perante as forças oclusais excessivas artificialmente geradas.

REFERÊNCIAS

- Amaral, M. F., Poi, W. R., Debortoli, C. V. L., Panzarini, S. R., & Brandini, D. A. (2017). The influence of traumatic occlusion on the repair process for teeth following subluxation. *Dental Traumatology*, 33(4), 245–254. <https://doi.org/10.1111/edt.12330>.
- Andreasen, F. M., & Pedersen, B. V. (1985). Prognosis of luxated permanent teeth—The development of pulp necrosis. *Endodontics & Dental Traumatology*, 1(6), 207–220. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.1985.tb00583.x>.
- Andreasen, F. M., Zhijie, Y., & Thomsen, B. L. (1986). Relationship between pulp dimensions and development of pulp necrosis after luxation injuries in the permanent dentition. *Endodontics & Dental Traumatology*, 2(3), 90–98. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.1986.tb00133.x>.
- Andreasen, F. M., Zhijie, Y., Thomsen, B. L., & Andersen, P. K. (1987). Occurrence of pulp canal obliteration after luxation injuries in the permanent dentition. *Endodontics & Dental Traumatology*, 3(3), 103–115. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.1987.tb00611.x>.
- Andreasen, J. O. (2012). Pulp and periodontal tissue repair—Regeneration or tissue metaplasia after dental trauma. A review. *Dental Traumatology*, 28(1), 19–24. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.2011.01058.x>.
- Andreasen, J. O., Andreasen, F. M., & Andersson, L. (2007). *Textbook and colors atlas of traumatic injuries to the teeth* (4^o ed). New York: Blackwell.
- Andreasen, J. O., & Bakland, L. K. (2012). Pulp regeneration after non-infected and infected necrosis, what type of tissue do we want? A review. *Dental Traumatology*, 28(1), 13–18. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.2011.01057.x>.

Bourguignon, C., Cohenca, N., Lauridsen, E., Flores, M. T., O'Connell, A. C., Day, P. F., Tsilingaridis, G., Abbott, P. V., Fouad, A. F., Hicks, L., Andreasen, J. O., Cehreli, Z. C., Harlamb, S., Kahler, B., Oginni, A., Semper, M., & Levin, L. (2020). International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 1. Fractures and luxations. *Dental Traumatology*, 36(4), 314–330. <https://doi.org/10.1111/edt.12578>.

Brandini, D. A., Debortoli, C. V. L., Felipe Akabane, S. T., Poi, W. R., & Amaral, M. F. (2018). Systematic review of the effects of excessive occlusal mechanical load on the periodontum of rats. *Indian Journal of Dental Research*, 29(6), 812–819. https://doi.org/10.4103/ijdr.IJDR_31_17.

Cărmizaru, M., Pleșea, I. E., Dragomir, L. P., Popescu, M. R., Uscatu, C. D., Șerbănescu, M. S., Alexandru, D. O., & Comănescu, T. M. (2018). Quantitative assessment of morphological changes of dental pulp components of teeth affected by occlusal trauma. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 59(3), 729–740.

Caviedes-Bucheli, J., Azuero-Holguin, M. M., Correa-Ortiz, J. A., Aguilar-Mora, M. V., Pedroza-Flores, J. D., Ulate, E., Lombana, N., & Munoz, H. R. (2011). Effect of experimentally induced occlusal trauma on substance p expression in human dental pulp and periodontal ligament. *Journal of Endodontics*, 37(5), 627–630. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.02.013>.

Caviedes-Bucheli, J., Gomez-Sosa, J. F., Azuero-Holguin, M. M., Ormeño-Gomez, M., Pinto-Pascual, V., & Munoz, H. R. (2017). Angiogenic mechanisms of human dental pulp and their relationship with substance P expression in response to occlusal trauma. *International Endodontic Journal*, 50(4), 339–351. <https://doi.org/10.1111/iej.12627>.

Cintra, L. T. A., Ferreira, L. L., Benetti, F., Gastélum, A. A., Gomes-Filho, J. E., Ervolino, E., & Briso, A. L. F. (2017). The effect of dental bleaching on pulpal tissue response in a diabetic animal model. *International Endodontic Journal*, 50(8), 790–798. <https://doi.org/10.1111/iej.12692>.

Clark, G. T., Tsukiyama, Y., Baba, K., & Watanabe, T. (1999). Sixty-eight years of experimental occlusal interference studies: What have we learned? *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 82(6), 704–713. [https://doi.org/10.1016/s0022-3913\(99\)70012-0](https://doi.org/10.1016/s0022-3913(99)70012-0).

Diangelis, A. J., Andreasen, J. O., Ebeleseder, K. A., Kenny, D. J., Trope, M., Sigurdsson, A., Andersson, L., Bourguignon, C., Flores, M. T., Hicks, M. L., Lenzi, A. R., Malmgren, B., Moule, A. J., Pohl, Y., Tsukiboshi, M., & International Association of Dental Traumatology. (2012). International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 1. Fractures and luxations of permanent teeth. *Dental Traumatology*, 28(1), 2–12. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.2011.01103.x>.

Dumsha, T., & Hovland, E. J. (1982). Pulpal prognosis following extrusive luxation injuries in permanent teeth with closed apexes. *Journal of Endodontics*, 8(9), 410–412. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(82\)80096-4](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(82)80096-4).

Fan, J., & Caton, J. G. (2018). Occlusal trauma and excessive occlusal forces: Narrative review, case definitions, and diagnostic considerations. *Journal of Periodontology*, 89 Suppl 1, S214–S222. <https://doi.org/10.1002/JPER.16-0581>.

Hermann, N. V., Lauridsen, E., Ahrensburg, S. S., Gerds, T. A., & Andreasen, J. O. (2012). Periodontal healing complications following extrusive and lateral luxation in the permanent dentition: A longitudinal cohort study. *Dental Traumatology*, 28(5), 394–402. <https://doi.org/10.1111/edt.12000>.

Junqueira, L. C., Montes, G. S., & Sanchez, E. M. (1982). The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. *Histochemistry*, 74(1), 153–156. <https://doi.org/10.1007/BF00495061>.

Kaku, M., Uoshima, K., Yamashita, Y., & Miura, H. (2005). Investigation of periodontal ligament reaction upon excessive occlusal load—Osteopontin induction among periodontal ligament cells. *Journal of Periodontal Research*, 40(1), 59–66. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2004.00773.x>.

Kawamoto, S., & Nagaoka, E. (2000). The effect of oestrogen deficiency on the alveolar bone resorption caused by traumatic occlusion. *Journal of Oral Rehabilitation*, 27(7), 587–594. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2842.2000.00542.x>.

Kilkenny, C., Browne, W., Cuthill, I. C., Emerson, M., Altman, D. G., & NC3Rs Reporting Guidelines Working Group. (2010). Animal research: Reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *British Journal of Pharmacology*, 160(7), 1577–1579. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00872.x>.

Killough, S. A., Lundy, F. T., & Irwin, C. R. (2009). Substance P expression by human dental pulp fibroblasts: A potential role in neurogenic inflammation. *Journal of Endodontics*, 35(1), 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.10.010>.

Kvinnsland, S., Heyeraas, K., & Ofjord, E. S. (1989). Effect of experimental tooth movement on periodontal and pulpal blood flow. *European Journal of Orthodontics*, 11(3), 200–205. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.ejo.a035986>.

Kvinnsland, S., Kristiansen, A. B., Kvinnsland, I., & Heyeraas, K. J. (1992). Effect of experimental traumatic occlusion on periodontal and pulpal blood flow. *Acta Odontologica Scandinavica*, 50(4), 211–219. <https://doi.org/10.3109/00016359209012765>.

Massaro, C. S., Consolaro, R. B., Santamaria, M., Consolaro, M. F. M. O., & Consolaro, A. (2009). Analysis of the dentin-pulp complex in teeth submitted to orthodontic movement in rats. *Journal of Applied Oral Science*, 17 Suppl, 35–42. <https://doi.org/10.1590/s1678-77572009000700007>.

Matsushita, K., Motani, R., Sakuta, T., Yamaguchi, N., Koga, T., Matsuo, K., Nagaoka, S., Abeyama, K., Maruyama, I., & Torii, M. (2000). The role of vascular endothelial growth factor in human dental pulp cells: Induction of chemotaxis, proliferation, and differentiation and activation of the AP-1-dependent signaling pathway. *Journal of Dental Research*, 79(8), 1596–1603. <https://doi.org/10.1177/00220345000790081201>.

Nakatsu, S., Yoshinaga, Y., Kuramoto, A., Nagano, F., Ichimura, I., Oshino, K., Yoshimura, A., Yano, Y., & Hara, Y. (2014). Occlusal trauma accelerates attachment loss at the onset of experimental periodontitis in rats. *Journal of Periodontal Research*, 49(3), 314–322. <https://doi.org/10.1111/jre.12109>.

Nishioka, M., Shiiya, T., Ueno, K., & Suda, H. (1998). Tooth replantation in germ-free and conventional rats. *Endodontics & Dental Traumatology*, 14(4), 163–173. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.1998.tb00832.x>.

Petti, S., Glendor, U., & Andersson, L. (2018). World traumatic dental injury prevalence and incidence, a meta-analysis-One billion living people have had traumatic dental injuries. *Dental Traumatology*, 34(2), 71–86. <https://doi.org/10.1111/edt.12389>.

Popescu, M. R., Deva, V., Dragomir, L. P., Searpe, M., Vătu, M., Ștefârță, A., & Rauten, A. M. (2011). Study on the histopathological modifications of the dental pulp in occlusal trauma. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 52(1 Suppl), 425–430.

Queiroz, A. F., Hidalgo, M. M., Consolaro, A., Panzarini, S. R., França, A. B., Pires, W. R., & Poi, W. R. (2019). Calcific metamorphosis of pulp after extrusive luxation. *Dental Traumatology*, 35(2), 87–94. <https://doi.org/10.1111/edt.12456>.

Rees, J. S. (2002). The effect of variation in occlusal loading on the development of abfraction lesions: A finite element study. *Journal of Oral Rehabilitation*, 29(2), 188–193. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2842.2002.00836.x>.

Santana, D. A., Fonseca, G. F., Ramalho, L. M. P., Rodriguez, T. T., & Aguiar, M. C. (2017). Effect of low-level laser therapy (λ780 nm) on the mechanically damaged dentin-pulp complex in a model of extrusive luxation in rat incisors. *Lasers in Medical Science*, 32(9), 1995–2004. <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2295-6>.

Shibue, T., Taniguchi, K., & Motokawa, W. (1998). Pulp and root development after partial extrusion in immature rat molars: A histopathological study. *Endodontics & Dental Traumatology*, 14(4), 174–181. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.1998.tb00833.x>.

Sodeyama, T., Maeda, T., Takano, Y., & Hara, K. (1996). Responses of periodontal nerve terminals to experimentally induced occlusal trauma in rat molars: An immunohistochemical study using PGP 9.5 antibody. *Journal of Periodontal Research*, 31(4), 235–248. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1996.tb00488.x>.

Spinas, E., Deias, M., Mameli, A., & Giannetti, L. (2021). Pulp canal obliteration after extrusive and lateral luxation in young permanent teeth: A scoping review. *European Journal of Paediatric Dentistry*, 22(1), 55–60. <https://doi.org/10.23804/ejpd.2021.22.01.10>.

Vanacker, J., Viswanath, A., De Berdt, P., Everard, A., Cani, P. D., Bouzin, C., Feron, O., Diogenes, A., Leprince, J. G., & des Rieux, A. (2014). Hypoxia modulates the differentiation potential of stem cells of the apical papilla. *Journal of Endodontics*, 40(9), 1410–1418. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.04.008>.

Wan, H., Sun, H., Sun, G., Li, X., & Shang, Z. (2012). The early phase response of rat alveolar bone to traumatic occlusion. *Archives of Oral Biology*, 57(6), 737–743. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.01.002>.

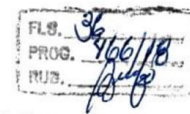
Yoshinaga, Y., Ukai, T., Abe, Y., & Hara, Y. (2007). Expression of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand relates to inflammatory bone resorption, with or without occlusal trauma, in rats. *Journal of Periodontal Research*, 42(5), 402–409. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2007.00960.x>.

Zerbinati, N., & Calligaro, A. (2018). Calcium hydroxylapatite treatment of human skin: Evidence of collagen turnover through picrosirius red staining and circularly polarized microscopy. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 11, 29–35. <https://doi.org/10.2147/CCID.S143015>.

ANEXO A – Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (UNESP)



**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 **"Influência da oclusão traumática na polpa de dentes submetidos à luxação extrusiva"**, Processo FOA nº 00466-2018, 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 18 de Setembro de 2018.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 18 de Setembro de 2020.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 18 Outubro de 2020.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Influence of traumatic occlusion on the pulp of the teeth submitted to extrusive luxation"**, Protocol FOA nº 00466-2018, 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 September 18, 2018.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: September 18, 2020.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: October 18, 2020.


Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
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 – Guide for Authors – Archives of Oral Biology

GUIDE FOR AUTHORS

Editors-in-Chief:

Professor S W Cadden, Dundee, Scotland

Dr Fionnuala T. Lundy, Northern Ireland, UK

Archives of Oral Biology is an international journal which aims to publish papers of the highest scientific

quality reporting new knowledge from the orofacial region including:

- developmental biology
- cell and molecular biology
- molecular genetics
- immunology
- pathogenesis
- microbiology
- biology of dental caries and periodontal disease
- forensic dentistry
- neuroscience
- salivary biology
- mastication and swallowing
- comparative anatomy
- paeleodontology

Archives of Oral Biology will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will consider clinical papers only where they make a significant contribution to the understanding of a disease process. These guidelines generally follow the [Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals](#)

Types of Contribution

Original papers and review articles are welcomed. There will be no differentiation on the basis of length into full or short communications. Editorial commentaries will also be considered but only by invitation. All submissions will be refereed.

Page charges

This journal has no page charges.

Submission checklist

You should use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check all relevant sections in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts (where applicable)

Highlights (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

- Relevant declarations of interest have been made
- Declarations of authors' contributions have been made if there are four or more authors
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#)

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex and gender](#) should be used correctly. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed. All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double anonymized) or the manuscript file (if single anonymized). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically, without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article is likely to be checked by the originality detection service CrossCheck.

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#).

Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that

one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing – original draft; Writing – review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to Authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and to provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement'. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases. For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be

asked to complete a 'License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

PREPARATION

Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our [Support Center](#).

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups.

[More information on types of peer review](#).

REVISED SUBMISSIONS

When submitting the revised manuscript, please make sure that you upload the final version of the paper with the changes highlighted. Please remove the old version(s) of the manuscript before submitting the revised version.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible.

Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns.

The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To minimize unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Manuscript Structure

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text (Introduction, Materials & Methods, Results, Discussion for an original paper), Acknowledgments, Appendix, References, Tables and then Figure Captions. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

Introduction

This should be a succinct statement of the problem investigated within the context of a brief review of the relevant literature. Literature directly relevant to any inferences or argument presented in the Discussion should in general be reserved for that section. The introduction may conclude with the reason for doing the work but should not state what was done nor the findings.

Materials and Methods

Enough detail must be given here so that another worker can repeat the procedures exactly. Where the materials and methods were exactly as in a previous paper, it is not necessary to repeat all the details but sufficient information must be given for the reader to comprehend what was done without having to consult the earlier work.

Authors are requested to make plain that the conditions of animal and human experimentation are as outlined in the "Ethics" and "Studies on Animals" sections above

Results or Findings

These should be given clearly and concisely. Care should be taken to avoid drawing inferences that belong to the Discussion. Data may be presented in various forms such as histograms or tables but, in view of pressure on space, presentation of the same data in more than one form is unacceptable.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is occasionally appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering

any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes. As titles frequently stand alone in indexes, bibliographic journals etc., and indexing of papers is, to an increasing extent, becoming computerized from key words in the titles, it is important that titles should be as concise and informative as possible. Thus the animal species to which the observations refer should always be given and it is desirable to indicate the type of method on which the observations are based, e.g. chemical, bacteriological, electron-microscopic, histochemical, etc. A "running title" of not more than 40 letters and spaces must also be supplied. A keyword index must be supplied for each paper.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Structured abstract

The paper should be prefaced by an abstract aimed at giving the entire paper in miniature. Abstracts should be no longer than 250 words and should be structured as per the guidelines published in the Journal of the American Medical Association (JAMA 1995; 273: 27-34). In brief, the abstract should be divided into the following sections: (1) Objective; (2) Design – if clinical, to include setting, selection of patients, details on the intervention, outcome measures, etc.; if laboratory research, to include details on methods; (3) Results; (4) Conclusions.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

As Archives of Oral Biology is a journal with a multidisciplinary readership, abbreviations, except those universally understood such as mm, g, min. u.v., w/v and those listed below, should be avoided if possible. Examples of abbreviations which may be used without definition are: ADP, AMP, ATP, DEAEcellulose, DNA, RNA, EDTA, EMG, tris. Other abbreviations used to improve legibility should be listed as a footnote on the title page as well as being defined in both the abstract and the main text on first usage. Chemical symbols may be used for elements, groups and simple compounds, but excessive use should be avoided. Abbreviations other than the above should not be used in titles and even these should be avoided if possible.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.) but who did not meet all the criteria for authorship (see Authorship section above).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements: Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research

institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Bacterial nomenclature

Organisms should be referred to by their scientific names according to the binomial system. When first mentioned the name should be spelt in full and in italics. Afterwards the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. '*S. aureus*' not 'Staph. Aureus'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the intended meaning unclear, the names of microbes should be spelt in full. Only those names which were included in the Approved List of Bacterial Names, Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 225-420 and those which have been validly published in the Int J Syst Bacteriol since 1 January 1980 have standing in nomenclature. If there is good reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the names should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text (for an example see Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 547-556). When the genus alone is used as a noun or adjective, use lower case Roman not italic, e.g. 'organisms were staphylococci' and 'streptococcal infection'. If the genus is specifically referred to use italics e.g. 'organisms of the genus *Staphylococcus*'. For genus in plural, use lower case roman e.g. '*salmonellae*'; plurals may be 52lsevier52d e.g. '*salmonellas*'. For trivial names, use lower case Roman e.g. '*meningococcus*'

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly.

For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Illustration services

[Elsevier's Author Services](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables should be placed on separate page(s) towards the end of the manuscript (see Manuscript Structure, above). Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

APA (American Psychological Association) 7th Edition

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Seventh Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be [ordered online](#) or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59. [Ttps://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372](https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372).

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2018). The art of writing a scientific article. *Heliyon*, 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

Reference to a website:

Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK. (2003). <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> Accessed 13 March 2003.

Reference to a dataset:

AUTHOR INFORMATION PACK 22 Jun 2021 www.elsevier.com/locate/archoralbio 12

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T. (2015). *Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions*. Mendeley Data, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to a conference paper or poster presentation:

Engle, E.K., Cash, T.F., & Jarry, J.L. (2009, November). The Body Image Behaviours Inventory-3: Development and validation of the Body Image Compulsive Actions and Body Image Avoidance Scales. Poster session presentation at the meeting of the Association for Behavioural and Cognitive Therapies, New York, NY.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the “References” section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#). For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

Statistical analysis

Authors should ensure that the presentation and statistical testing of data are appropriate and should seek the advice of a statistician if necessary. A number of common errors should be avoided, e.g.: -

- Use of parametric tests when non-parametric tests are required
- Inconsistencies between summary statistics and statistical tests such as giving means and standard deviations for data which were analysed with non-parametric tests.
- Multiple comparisons undertaken with multiple t tests or non-parametric equivalents rather than with analysis of variance (ANOVA) or non-parametric equivalents.
- Post hoc tests being used following an ANOVA which has yielded a non-significant result.

- Incomplete names for tests (e.g. stating "Student's t test" without qualifying it by stating "single sample", "paired" or "independent sample")
- n values being given in a way which obscures how many independent samples there were (e.g. stating simply $n=50$ when 10 samples/measurements were obtained from each of 5 animals/human subjects).
- Stating that $P=0.000$ (a figure which is generated by some computer packages). The correct statement (in this case) is $P<0.0005$.

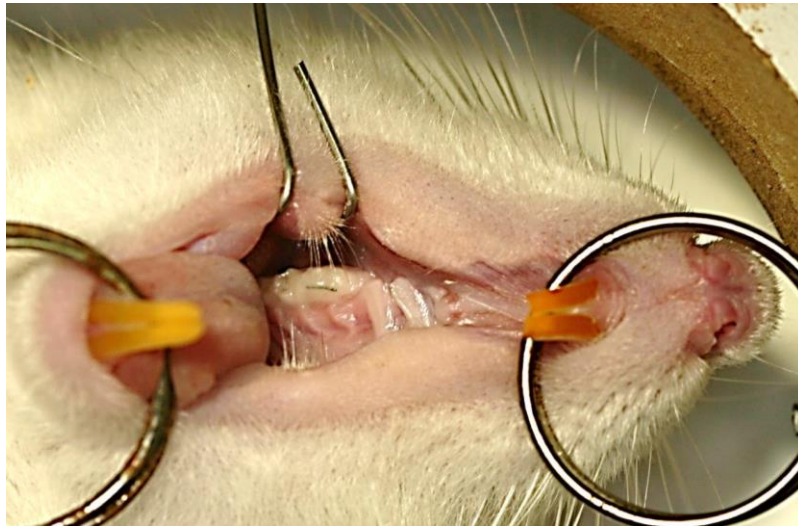
AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

ANEXO C – Método de indução da oclusão traumática e utilização do software Image J

Indução da oclusão traumática no primeiro molar superior direito (1º MSD) de rato Wistar, macho, de 12 semanas de idade. Platô de resina composta sobre a superfície oclusal com fio metálico padronizando espessura do platô



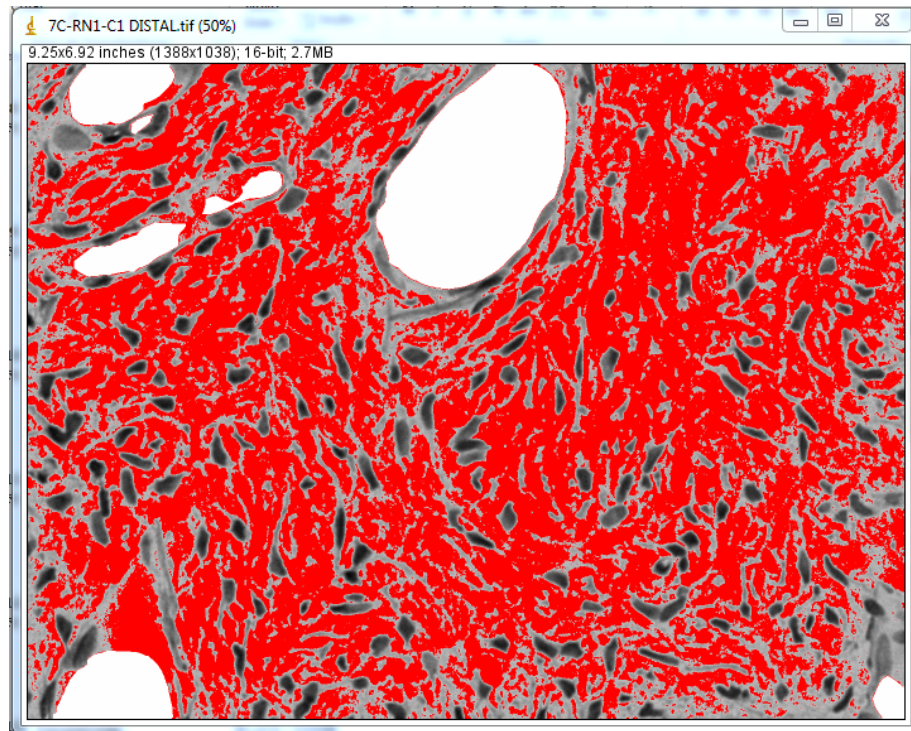
Fonte: Elaborada pelo Autor (2021)

Maxila de rato dissecada 30 dias após a indução da oclusão traumática no primeiro molar superior direito (1º MSD)



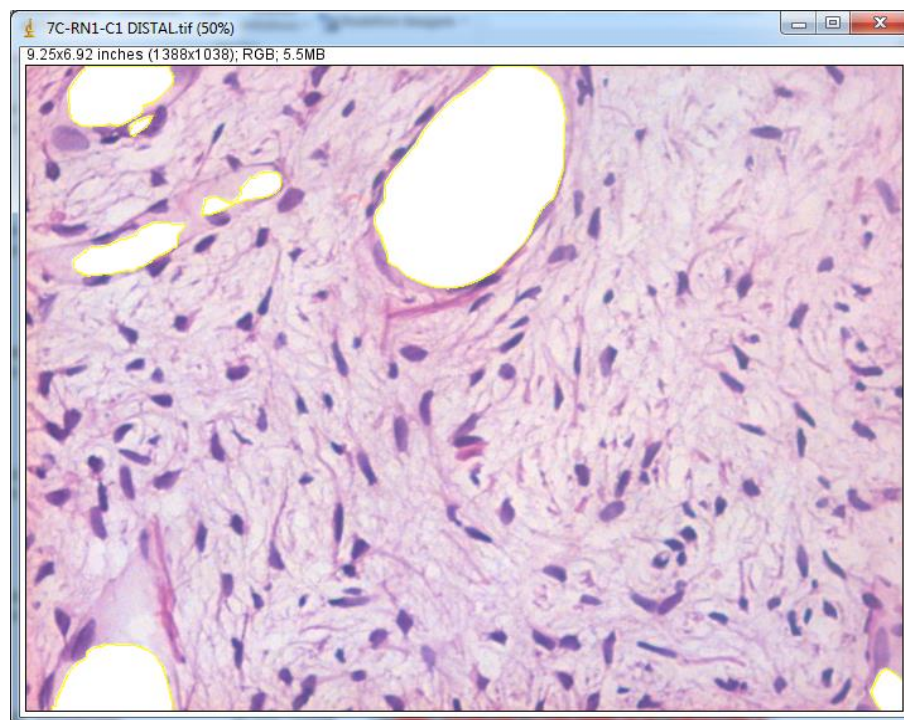
Fonte: Elaborada pelo Autor (2021)

Quantificação por contraste da área de matriz extracelular utilizando o software Image J de fotomicrografia da polpa coronária de rato em objetiva de 40x



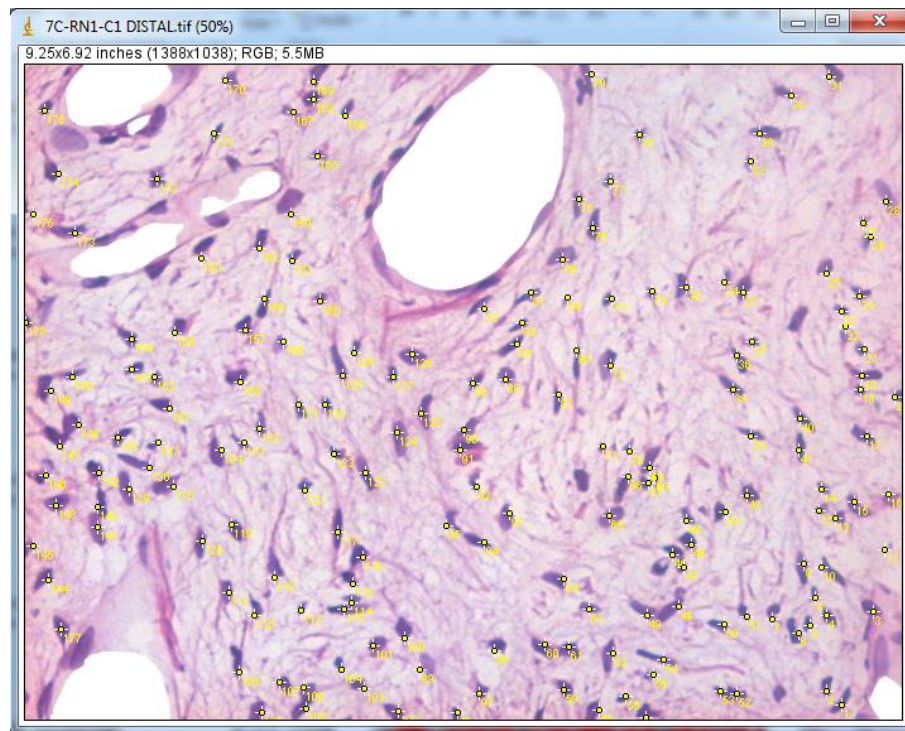
Fonte: Elaborada pelo Autor (2021)

Quantificação da área de vasos sanguíneos através de seleção em fotomicrografia da polpa coronária de rato em objetiva de 40x, utilizando o software Image J



Fonte: Elaborada pelo Autor (2021)

Quantificação dos perfis nucleares através da contagem pela ferramenta “multi point” do software Image J em fotomicrografia da polpa coronária de rato em objetiva de 40x



Fonte: Elaborada pelo Autor (2021)