

IGOR MARIOTTO BENETI

**O EFEITO DA CARGA OCLUSAL NO
PROCESSO DE REPARO DO LIGAMENTO
PERIODONTAL APÓS REIMPLANTE
IMEDIATO EM MOLAR DE RATOS:
AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E
IMUNOISTOQUÍMICA.**

Araçatuba - São Paulo

2012

IGOR MARIOTTO BENETI

**O EFEITO DA CARGA OCLUSAL NO PROCESSO DE REPARO DO
LIGAMENTO PERIODONTAL APÓS REIMPLANTE IMEDIATO EM
MOLAR DE RATOS: AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA.**

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

Orientadora: Daniela Atili Brandini

Co-Orientador: Claudio Aparecido Casatti

Araçatuba - São Paulo

2012

Catalogação na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Beneti, Igor Mariotto.

B465e Efeito da carga oclusal no processo de reparo do ligamento periodontal após reimplante imediato em molar de ratos : avaliação histológica e imunoistoquímica / Igor Mariotto Beneti. - Araçatuba : [s.n.], 2012

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

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Atili Brandini

1. Reimplante dentário 2. Oclusão dentária traumática
3. Imunoistoquímica 4. Caspase 3 5. Ligamento periodontal

Black D7

CDD 617.64

Dedicatórias



Especiais

A Deus,

*Obrigado, meu pai, por tudo que tem realizado em
minha vida. Foram 2 anos e meio de momentos de
alegria, tristeza, erros e acertos e muito crescimento.*

*Tudo isso foi mais fácil de passar com a fé e certeza de sua
presença ao meu lado sempre.*

Aos meus Pais Wander e Valdira,

Pai e mãe sem dúvidas essa conquista é mais de vocês do que minha. Se não fosse todo apoio e alicerce que vocês sempre me deram as coisas seriam muito mais difíceis ou até mesmo impossíveis de serem conquistadas. Agradeço por todo amor e dedicação de vocês sempre para o meu crescimento e formação. Agradeço a Deus todos os dias por ter vocês em minha vida, não poderia ter pessoas mais especiais em minha vida que vocês dois.

Ào meu irmão, Jan,

Kiko você é um anjo que o cara lá de cima me deu de presente.

Um cara que apesar de 5 anos mais novo é muito mais velho que

eu. Seus conselhos, companheirismo e amizade são eternos meu

irmão. Amo muito você e saiba que essa conquista é sua também.

Obrigado por tudo.

Ao meu amor, Aline Leonardi Vieira,

Aline, como você é importante para mim meu amor. Você é a pessoa que quero do meu lado pelo resto da minha vida. Dedico esse trabalho a você que sempre me apoiou e aguentou todo o sofrimento da distância. Obrigado por todo seu amor e por ter acreditado nesse amor, o qual realmente me manteve em pé e me reergueu nos momentos que cai. Obrigado Senhor por colocar meu amor na minha vida.

Aos meus Avós Waldemar, Luis e Sebastiana

*Mesmo hoje não estando mais aqui, não tem como não dedicar
essa conquista a vocês. Sem dúvidas tenho muito amor e
lembranças maravilhosas de vocês. Obrigado por todo amor e
momentos felizes sempre.*

A minha avó Ruthe,

*Minha vizinha, ou melhor, minha segunda mãe, esse dia tão
feliz dedico a você também. Obrigado por todo amor, dedicação e
carinho sempre.*

Ao meu tio avô,

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

Ao meu Padrinho, Valdemar Mariotto Filho,

Tio Maginho, meu espelho na odontologia, dedico ao senhor essa conquista.

Aos meus Familiares

Aos meus tios e tias Carlos, Walter, Wilson, Gilda,

Neusa, Silvia e os primos Andressa, Daniel e

Pedro. Obrigado pela torcida e apoio de vocês sempre.

In Memoriam,

Dedico essa Dissertação ao meu amigo-irmão Daniel Castro Corbucci. Gina, mesmo você não estando mais entre nós sei que está muito feliz com essa minha conquista, meu amigo. Esse trabalho é em sua homenagem, afinal, era para você também estar aqui conquistando o seu título de mestre, mas Deus resolveu levar você para ser professor ao lado dele em um lugar bem maior e melhor que esse. Sei que nos momentos difíceis em que pedi sua ajuda com certeza recebi. Obrigado pelos momentos de amizade e alegria compartilhados.

A minha Orientadora,

Professora Daniela Atili Brandini, ou melhor,

Dani, porque assim que chamo a pessoa que além de orientadora é em primeiro lugar uma amiga. Obrigado

por toda a paciência, dedicação, ensinamentos e amizade. Desculpe as horas de nervoso que lhe causei.

Obrigado por todos os conhecimentos e oportunidades de aprendizado.

Ao Professor Idelmo Rangel Garcia Junior,

Mestre que mostrou como deve ser o papel de professor, sempre estimulando o aluno a pensar. Pessoa mais humana com os pacientes que conheço e de um coração sem tamanho. Professor, obrigado pelos ensinamentos e amizade nessa caminhada. Ficam aqui meus eternos agradecimentos pelos ensinamentos.

Aos meus Orientadores na graduação,

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

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

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

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

Ào meu Coorientador,

Professor Cláudio Aparecido Casatti, muito obrigado por todos ensinamentos, oportunidades de crescimento e confiança em mim. O senhor é um exemplo de ética na pesquisa que quero sempre ter como espelho.

Aos meus amigos,

Não posso deixar de agradecer a torcida dos amigos mais próximos Daniel Almeida, Milene, Leticia, Junior, Luana, Antônio, Rodolfo, Guilherme, Elton, Rubens, Matheus, Tiago, Ederson, Lucas, Carlos, Bruno, Daniel Magosso e Conceição.

Aos Professores da Cirurgia,

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

Professora Dra. Alessandra Marcondes Franega, obrigado por toda confiança, dedicação, preocupação e orientação desde a época de graduação. Você é um exemplo de dedicação e luta pela cirurgia professora. Obrigado pela amizade.

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

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

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

Obrigado pelas orientações e sugestões.

A Professora Dra. Daniela Pongoni, apesar do pouco tempo de convivência obrigado por toda ajuda e ensinamentos nesse período.

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

O Professor Francisley Ávila Souza, obrigado pelo convívio e ensinamentos.

Aos Docentes da Faculdade de Odontologia de Aracatuba-

UNESP: Professores (as) Doutores (as) Celso Koogi

Sonoda, Denise Pedrini Ostini, Wilson Roberto Poi,

Sônia Regina Pangarini Barioni, Wirley Gonçalves

Assunção, Paulo Henrique dos Santos, Eduardo Passos

Rocha, Edilson Ervolino, Alaíde Gonçalves, José

Américo de Oliveira, Paulo Roberto Botacin, Roelf

Justino Cruz Rizzolo, João César Bedran de Castro pelos

ensinamentos e disponibilidade em ajudar sempre.

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

Obrigado por toda amizade Cleidinha.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Ciências Básicas: Bernadete Maria Nunes Kimura, Maria Dirce Colli Boatto, Gilmar Martins de Oliveira, Aparecida Leontina Baiocchi de Carvalho, Paulo Roberto Gratão, André Luís Mattos Piedade, Sandra Aparecida dos Santos Pinheiro, Arnaldo César dos Santos agradeço pelos ensinamentos e preocupação ajuda em diversas

etapas laboratoriais da tese, pela compreensão e agradáveis momentos compartilhados.

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

Aos amigos em especial Lamis, Pamela, Fernando, Abrahão, Pedro, Rodolfo, Cristiano, Cassiano e Heloísa.

Obrigado por todos os momentos de alegria e companheirismo durante esse período.

*Aos estagiários Bruno, Luan, Vanessa, Sara, Marina e
Corolina muito obrigado pela ajuda e amizade nesse período.*

Aos Funcionários do biotério Seu Camilo, João e Allan.

*Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia
de Aracatuba - UNESP (Izamar, Cláudio,
Alexandra, Maria Cláudia, Cláudio, Ana Cláudia,
Isabel, Ana Paula, Luzia, Fátima Denise, João e
Irene), pela disponibilidade em ajudar sempre e pelo carinho.*

*A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
Superior - CAPES, pelo apoio financeiro concedido por
meio da Bolsa de Mestrado que contribuiu, sobretudo, com
a realização deste trabalho.*

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de Bolsa de mestrado (processo número 2010/1058-1), indispensáveis para a realização deste trabalho.

Epígrafe



Eclesiastes 3

*Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito
debaixo do céu.*

*Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de
arrancar o que se plantou;*

*Tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derrubar, e tempo de
edificar;*

Tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de prantear, e tempo de dançar;

*Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar,
e tempo de afastar-se de abraçar;*

Tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de lançar fora;

Tempo de rasgar, e tempo de coser; tempo de estar calado, e tempo de falar;

Tempo de amar, e tempo de odiar; tempo de guerra, e tempo de paz.

Que proveito tem o trabalhador naquilo em que trabalha?

Tenho visto o trabalho que Deus deu aos filhos dos homens, para com ele os exercitar.

Tudo fez formoso em seu tempo; também pôs o mundo no coração do homem, sem que este possa descobrir a obra que Deus fez desde o princípio até ao fim.

Já tenho entendido que não há coisa melhor para eles do que alegrar-se e fazer bem na sua vida;

E também que todo o homem coma e beba, e goze do bem de todo o seu trabalho; isto é um dom de Deus.

Eu sei que tudo quanto Deus faz durará eternamente; nada se lhe deve acrescentar, e nada se lhe deve tirar; e isto faz Deus para que haja temor diante dele.

O que é, já foi; e o que há de ser, também já foi; e Deus pede conta do que passou.

Ví mais debaixo do sol que no lugar do juízo havia impiedade, e no lugar da justiça havia iniquidade.

Eu disse no meu coração: Deus julgará o justo e o ímpio; porque há um tempo para todo o propósito e para toda a obra.

Disse eu no meu coração, quanto a condição dos filhos dos homens, que Deus os provaria, para que assim pudessem ver que são em si mesmos como os animais.

Porque o que sucede aos filhos dos homens, isso mesmo também sucede aos animais, e lhes sucede a mesma coisa; como morre um, assim morre o outro; e todos têm o mesmo fôlego, e a vantagem dos homens sobre os animais não é nenhuma, porque todos são vaidade.

Todos vão para um lugar; todos foram feitos do pó, e todos voltarão ao pó.

Quem sabe que o fôlego do homem vai para cima, e que o fôlego dos animais vai para baixo da terra?

Assim que tenho visto que não há coisa melhor do que alegrar-se o homem nas suas obras, porque essa é a sua porção; pois quem o fará voltar para ver o que será depois dele?

RESUMO

BENETI IM. O efeito da carga oclusal no processo de reparo do periodonto após reimplante imediato em molar de ratos. Avaliação histológica e imunoistoquímica. (Dissertação). Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2012.

Busca-se ainda encontrar o melhor tratamento para os casos de reimplantes imediatos ou tardios, visto que estes seriam considerados os tratamentos ideais em caso de avulsão. Fatores como período extra-alveolar, meios de conservação, contaminação, fase de rizogênese dental, uso de contenção e trauma oclusal podem interferir no prognóstico dos reimplantes. A função oclusal favorável é um estímulo mecânico necessário para a manutenção da homeostasia dos tecidos periodontais, já a falta ou o excesso de carga oclusal resulta na desarmonia do funcionamento dos tecidos periodontais. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da carga oclusal após o processo de reparo de reimplante imediato em molares de ratos. Foram utilizados 280 ratos wistars divididos em três grupos experimentais (oclusão normal, infraoclusão e supraoclusão) e um grupo controle total, os mesmos foram divididos em nove períodos. As análises qualitativas e quantitativas foram realizadas em cortes histológicos corados pelo método da hematoxilina e eosina, e imunorreatividade para apoptose celular. Os dados foram comparados através da análise de variância (ANOVA), Kruskal-Wallis e Bonferroni como teste post-hoc, considerando $p < 0,05$ como significativo. No período inicial (1 a 3 ou 5 dias) a espessura do espaço do LPD (ligamento periodontal) do terço cervical dos dentes reimplantados, apresentou um aumento estatisticamente significativo da espessura em todos os grupos experimentais quando comparados ao grupo controle total. O grupo oclusão normal e infraoclusão apresentaram uma redução na porcentagem da área de vasos, perfil celular e espessura do espaço do LPD, na maioria dos períodos estudados. O grupo supraoclusão apresentou uma maior reabsorção radicular, seguido dos grupos oclusão normal e infra-oclusão. Concluiu-se que a carga oclusal recebida pelos dentes reimplantados modifica o padrão do processo de reparo do ligamento periodontal; e que o trauma oclusal acelera significativamente a reabsorção radicular dos dentes reimplantados.

Palavras-chave: reimplante dentário, oclusão dentária traumática, imunoistoquímica.

ABSTRACT

BENETI IM. The effect of occlusal load on the repair process of the periodontal ligament after immediate replantation in rat molars. Histological and immunohistochemical assessment. (Dissertation). Araçatuba: School of Dentistry, São Paulo State University, 2012.

An ideal protocol treatment for cases of immediate or delayed tooth replantation hasn't been developed yet, although tooth replantation is considered the best treatment in cases of tooth avulsion. Factors like extra-alveolar time, storage, contamination, dental rizogenesis phase, use of a splint, and occlusal trauma can interfere in the replantation prognosis. The normal occlusal function is a mechanical stimulus that is necessary for the maintenance of the homeostasis of periodontal tissue, whereas the absence or excess of occlusal load results in a disharmonic functioning of periodontal tissues. The aim of this study is to assess the influence of occlusal load during the repair process of immediate and delayed replantation of rat molars. They used 280 Wistar rats divided into three groups (normal occlusion, and infraocclusion supraocclusão) and a control group total, they were divided into nine periods. Qualitative and quantitative analysis will be performed in histological cuts, using the hematoxylin eosin staining protocol, and cells that display immunoreactivity to cellular apoptosis. The data will be submitted to variance analysis A or Kruskal-Wallis), using SPSS 16.0 at a significance level of $p < 0.05$. In the initial period the thickness of the cervical third of the PDL of replanted teeth showed a statistically significant increase in all test groups, compared to the control group. A percentage reduction of blood vessel area, cell profile and PDL thickness was observed in the majority of studied periods. The supra-occlusal group showed a higher level of radicular resorption, followed by the normal and infra-occlusion groups. In face of the limitations of this study, it was concluded that the occlusal load absorbed by replanted teeth modifies the repair process of the PDL. Occlusal trauma accelerates the radicular resorption of replanted teeth significantly.

Keywords: Tooth Replantation, Dental Occlusion, Traumatic, , Immunohistochemistry.

Lista de Figuras

- Figura 1 Apresentação esquemática da técnica de Kvinnsland (1991), para extração de molares de ratos
- Figura 2 Apresentação do corte mesio-distal do primeiro molar superior direito. A área avaliada está indicada pelo retângulo. Barra= 400 μ m
- Figura 3 Quantificação no programa ImageJ do perímetro(a), área de reabsorção(b), espessura do espaço do ligamento periodontal(c), e área de anquilose(d).
- Figura 4 Apresentação do corte longitudinal do ligamento periodontal no terço cervical da raiz mesial do primeiro molar superior direito. A área avaliada está indicada pelo retângulo. Barra= 25 μ m
- Figura 5 Quantificação no programa ImageJ da área de perfil nuclear(a), matriz extracelular(b), substância amorfa(c) e vasos sanguíneos(d).
- Figura 6 Fotomicrografia em microscopia de luz de corte histológico corado com hematoxilina e eosina, mostrando o terço médio da região do periodonto do animal do grupo oclusão normal com 1 dia de pós-operatório. Abreviaturas: C, cemento celular; D, dentina; LP, ligamento periodontal; OA, osso alveolar.

Figura 7 Fotomicrografia em microscopia de luz de corte histológico corado com hematoxilina e eosina, mostrando a o terço apical (A) e médio-apical (B) da região do periodonto do animal do grupo oclusão normal com 3 dias de pós-operatório. Abreviaturas: LP, ligamento periodontal; AO, osso alveolar; RD, raiz dentária.

Figura 8 Fotomicrografia em microscopia de luz de corte histológico corado com hematoxilina e eosina, mostrando a região do primeiro molar superior de animais do grupo infraclusão com 3 dias (A), 5 dias (B) e 21 dias (C) de pós-operatório. Em A-C, observar a presença de matriz extracelular fibrilar (seta maior), células semelhantes a fibroblastos (cabeça de seta), vasos sanguíneos dilatados (seta menor) e matriz extracelular não fibrilar (asterisco).

Figura 9 Fotomicrografia em microscopia de luz de corte histológico corado com hematoxilina e eosina, mostrando o terço apical (A), septo interradicular (B) e médio-apical da região do periodonto do animal do grupo infraclusão com 5 dias de pós-operatório e terço médio-apical com 7 dias de pós-operatório (C).

Figura 10 Fotomicrografia em microscopia de luz de corte histológico corado com hematoxilina e eosina, mostrando a região do primeiro molar

superior de animal do grupo infraoclusão com 21 dias de pós-operatório (A), supraoclusão com 30 dias(B), com 45 dias de pós-operatório do grupo oclusão normal (C) e 60 dias de pós-operatório do grupo oclusão normal (D).

Figura 11 Fotomicrografia em microscopia de luz de corte histológico submetido à identificação da proteína caspase-3 por meio do método da imunoperoxidase indireta de animais do grupo oclusão normal.



Lista de Gráficos

- Gráfico 1 Porcentagem da área dos perfis nucleares do ligamento periodontal no terço cervical da porção distal da raiz mesial, capturado com a objetiva de 100x.
- Gráfico 2 Espaço do ligamento periodontal no terço cervical da porção distal da raiz mesial, capturado com a objetiva de 4x.
- Gráfico3 Espaço do ligamento periodontal no terço médio da porção distal da raiz mesial, capturado com a objetiva de 4x.
- Gráfico 4 Espaço do ligamento periodontal no terço apical da porção distal da raiz mesial, capturado com a objetiva de 4x.
- Gráfico 5 Porcentagem da área de matriz extracelular no ligamento periodontal no terço cervical da porção distal da raiz mesial, capturado com a objetiva de 100x.
- Gráfico 6 Porcentagem da área de substância amorfa no ligamento periodontal no terço cervical da porção distal da raiz mesial, capturado com a objetiva de 100x.

- Gráfico 7 Porcentagem da área de reabsorção da porção distal da raiz mesial, capturado com a objetiva de 4x.
- Gráfico 8 Porcentagem da área de vasos sanguíneos no ligamento periodontal no terço cervical da porção distal da raiz mesial, capturado com a objetiva de 100x.
- Gráfico 9 Porcentagem da área de anquilose na porção distal da raiz mesial, capturado com a objetiva de 4x.
- Gráfico 10 Número de perfis nucleares no ligamento periodontal do terço cervical da porção distal da raiz mesial, capturado com a objetiva de 100x.

Sumário

1. Introdução.....	39
2. Proposição.....	43
3. Material e Método.....	44
3.1 Animais e procedimentos cirúrgicos.....	45
3.2 Perfusão transcardíaca e processamento histológico.....	47
3.3 Imunoistoquímica para identificação de marcadores de morte celular.....	48
3.4 Forma de análise dos resultados.....	49
3.5 Análise histológica.....	50
3.6 Análise Estatística.....	50
4. Resultados.....	51
5. Discussão.....	60
6. Conclusão.....	68
7. Referências Bibliográficas.....	70
8. Anexos.....	75

INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

A avulsão dental representa de 0.5 a 16% dentre os traumas faciais¹. Sendo os principais fatores etiológicos as práticas desportivas, agressão física, acidentes automobilísticos e perda de consciência^{2,3}. O reimplante imediato é o melhor tratamento e pode ser realizado imediatamente após o trauma, pelo próprio acidentado ou acompanhante, no local do acidente^{4,5}. Em virtude de fatores, tais como, outros traumas corporais ou faciais³ e falta de acesso imediato ao cirurgião dentista, o protocolo de atendimento clínico não é possível de ser realizado no tempo e condições almejadas.

Dentre os fatores que podem interferir no prognóstico do reimplante imediato temos a fase de rizogênese dental, o período extra-alveolar, meios de conservação, manipulação dental, contaminação, uso de contenção dental^{3,6,7} e o trauma oclusal.

O trauma oclusal nesta situação pode ser gerado por fatores preexistente ou relacionado ao acidente. Entre os fatores preexistentes mais freqüentes estão o contato oclusal prematuro, bruxismo e apertamento dental^{3,5}. Os fatores relacionados ao traumatismo dento-facial que podem alterar a oclusão são o reposicionamento inadequado do dente, fratura óssea dos maxilares com deslocamento e sem tratamento, deslocamento do disco e/ou edema das articulações temporomandibulares.

Na manutenção e restabelecimento da saúde do periodonto, o ligamento periodontal desempenha grandes funções como suporte dental, propriocepção, nutrição, homeostasia e reparo. As funções de homeostasia e reparo são as mais significantes no processo de reimplante dental, que ocorrem através da regulação de fatores de

crescimento e diferenciação celular^{8,9}. A proliferação e apoptose celular ocorrem em diferentes tempos e padrões para a manutenção do espaço do ligamento periodontal após o reimplante¹⁰.

A carga oclusal é um importante estímulo para remodelação óssea e estabelecimento do espaço do ligamento periodontal, por meio da interação entre diferentes células^{8,11}. A carga oclusal favorável é considerada um estímulo necessário para a manutenção da homeostasia dos tecidos periodontais, por meio da sua estimulação mecânica^{12,13}. Já a falta ou ao excesso de forças oclusais resultam na desarmonia do funcionamento dos tecidos periodontais¹².

Diante de uma força oclusal excessiva conhecida como trauma oclusal, observam-se alterações morfofuncionais como desorientação e diminuição das fibras colágenas^{14,15}, alteração no alinhamento das fibras periodontais¹⁶⁻¹⁷, aumento do número de fibroblastos¹⁴, aumento da atividade osteoclástica¹⁴⁻¹⁶, trombose venosa¹⁴ e necrose do ligamento periodontal¹⁶. Estudando o período inicial (até 7 dias) da injúria provocada pelo trauma oclusal observou-se um aumento da pressão do líquido intersticial do ligamento periodontal (48h)¹⁴, diminuição do espaço do ligamento periodontal até o 5º dia, tendo sua espessura regularizada no 7º dia¹⁸, provavelmente em virtude da remodelação óssea¹².

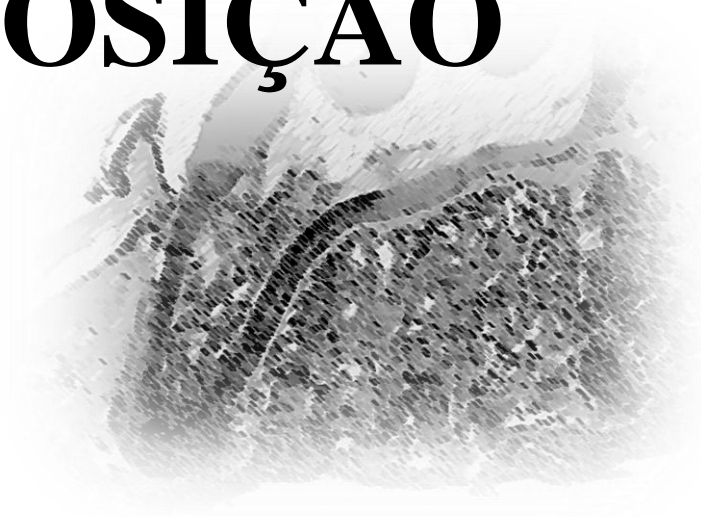
Estudos que compararam grupos com contato dental e sem contato dental após transplante¹⁹ ou reimplante dental^{9,20} mostraram que a ausência de contato dental provoca anquilose (15 dias)^{19,20}, diminuição do espaço do ligamento periodontal¹⁹⁻²¹, diminuição na formação de osteoblastos e osteoclastos⁹; diminuição da presença de peptídeo intestinal vasoativo⁹, redução no fator de crescimento de fibroblastos²⁰ e redução na expressão de periostina¹³.

Para estudar os mecanismos envolvidos no reparo celular do reimplante dentário, frente à carga oclusal deletéria, a avaliação histológica é uma ferramenta metodológica que pode auxiliar na compreensão e justificativa dos fatos evidenciados. O complexo mecanismo para regular a reparo e homeostasia do ligamento periodontal, provavelmente deve conseguir explicar dois tipos diferentes de mecanismos regulatórios; sendo o mecanismo de calcificação para produção de osso e outro de não calcificação para manter um espaço fixo do ligamento periodontal⁸.

A Cisteína Ácido aspártico protease específico (*Cysteine-Aspartic Acid Protease* - CASPASE-3) responsável por evidenciar apoptose celular ^{11,22}. Esse marcador fornece por meio da imunistoquímica informações importantes para a compreensão do metabolismo ósseo.

Deste modo, o estudo histológico e imunistoquímico do efeito da carga oclusal no processo de reparo de reimplantes imediatos; mostra-se complementar a literatura existente.

PROPOSIÇÃO



2. OBJETIVO

O propósito desse estudo foi investigar a influência da carga oclusal durante o processo de reparo de reimplante imediato em molares de ratos.

2.1.1 Objetivos específicos

Avaliar as diferenças entre os grupos (oclusão normal, infraoclusão e supraoclusão) empregando:

- a) Análise qualitativa do reparo no ligamento periodontal (inflamação, organização das fibras colágenas, espessura do espaço do ligamento periodontal, reabsorções dentária e óssea; e anquilose).
- b) Análise quantitativa do reparo no ligamento periodontal (espessura do espaço do ligamento periodontal, porcentagem do perfil de reabsorção e anquilose, número total de células, porcentagem da área do perfil celular, matriz extracelular, substância amorfa e vasos sanguíneos).

MATERIAL E

MÉTODOS

A grayscale microscopic image showing a textured surface, possibly a material's microstructure or a biological surface. The image is partially obscured by the text 'MÉTODOS' and has a soft, faded appearance.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais e procedimentos cirúrgicos

Este estudo seguiu as normas estabelecidas pelo “Canadian Council on Animal Care – Guide to the Care and Use of Experimental Animals”, e os protocolos experimentais (nº2010-05125) foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (UNESP).

Para este estudo, foram utilizados 280 ratos, Wistar adulto-jovens (*Rattus norvegicus*) com 5 semanas de vida, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (UNESP), sendo os animais transferidos para o Biotério de manutenção do Departamento Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (UNESP), 5 dias antes do experimento. Estes foram acondicionados em gaiolas, cada uma com cinco animais, alimentados com ração granulada e água *ad libitum* e mantidos em ciclo de claro/escuro de 12/12 horas a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e $50 \pm 10\%$ de umidade relativa.

Para avaliar a influência da carga oclusal no processo de reparo do ligamento periodontal em dentes reimplantados, os animais foram divididos em 4 grupos: controle total, oclusão normal, infraclusão e supraclusão. Os períodos estudados foram de 1 dia, 3, 5, 7, 14, 21, 30, 45 e 60 dias. Os grupos consistiram em:

- a. Grupo controle total (naive) – composto por animais que não foram submetidos à condição experimental;

- b. Grupo com oclusão normal (controle) – consiste de reimplante imediato no primeiro molar superior direito, sem alteração no primeiro molar inferior direito; ou seja, sem alteração oclusal intencional;
- c. Grupo infraoclusão – consiste de reimplante imediato no primeiro molar superior direito e ausência de contato com o dente antagonista;
- d. Grupo supraoclusão - consiste de reimplante imediato no primeiro molar superior direito, com indução de carga oclusal acentuada no dente reimplantado.

Antes da cirurgia experimental, os animais foram previamente anestesiados (i.m.) com solução de cloridrato de ketamina (25 mg/kg, Vetanarcol, Laboratórios König, Argentina) e xilazina (10 mg/kg, Coopazine, Coopers Brasil, Brasil). Os ratos dos grupos infraoclusão e supraoclusão receberam os seguintes tratamentos antes da cirurgia.

Os ratos do grupo de infraoclusão sofreram a redução da superfície oclusal do primeiro e segundo molares inferiores direito com broca diamantada em alta rotação e irrigação abundante, até que fosse eliminado todo o contato com o dente antagonista, sem provocar exposição pulpar.

Nos ratos do grupo supraoclusão, a superfície oclusal do primeiro molar inferior direito foi aumentada com restauração direta de resina composta. Antes de serem feitas as restaurações oclusais, foram realizadas microretenções com broca Carbide FG ¼ (Beavers Dental, Canada) em caneta de alta rotação com irrigação. A restauração oclusal foi realizada utilizando-se ácido fosfórico a 37% (FGM, Brasil) em esmalte e dentina, microbrush (Microbrush® International, Grafton, USA); adesivo scotchbond multi-purpose (3M ESPE, Sant Paul, USA), resina composta Estelite e Quick (Tokuyama Dental Corp, Japan) e fotopolimerizador (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, Brasil), como indicado pelo fabricante. Assim, criou-se uma mesa oclusal plana na altura das cúspides.

Uma vez imobilizado o animal, foi realizado a anti-sepsia da porção anterior e posterior das maxilas com polivinilpirrolidona-iodo (Riodeine - Ind. Farmac. Rioquímica Ltda), utilizando a metodologia de kvinnslund (1991) (Figura 1) foi realizada a sindesmotomia, luxação e avulsão do primeiro molar superior direito com auxílio de instrumental especialmente adaptado. Os dentes avulsionados foram imediatamente reposicionados no alvéolo para todos os grupos experimentais.

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

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

3.2. Perfusão transcardíaca e processamento histológico

Para a perfusão transcardíaca, os animais foram anestesiados com solução de cloridrato de ketamina (25 mg/kg, Vetanarcol, Laboratórios König, Argentina) e xilazina (10 mg/kg, Coopazine, Coopers Brasil, Brasil). Os animais receberam previamente injeção intraventricularmente de heparina (0,1 ml/5.000 U.I/ml) e após 10 segundos, foram perfundidos, via aorta, com solução salina a 0,9% (100 ml), seguido de solução fixadora (300 ml) de paraformaldeído (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) a 4% em tampão fosfato de sódio (PB) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) a 0,1 M, pH 7,4 a 4°C. As maxilas foram imediatamente dissecadas e pós-fixadas

na mesma solução fixadora durante 24 horas a 4°C. Em prosseguimento, os espécimes foram lavados em PB e submetidos à descalcificação em EDTA a 10% em PB, durante 20 dias e lavadas exaustivamente em PB.

Os espécimes foram desidratados em soluções crescentes de álcoois, diafanizadas em xilóis, impregnadas em parafina de baixa temperatura de fusão (56-58 °C) durante 3 horas e inclusos com orientação pré-estabelecida e padronizada. Os cortes histológicos de 5 µm de espessura foram obtidos, no sentido sagital, em micrótomo rotativo automático (Leica SMR 2000); transferidos em banho-maria (40-50 °C) e coletados em lâminas silanizadas.

Os cortes histológicos coletados foram submetidos aos métodos de coloração da hematoxilina-eosina para análise histológica qualitativa e quantitativa em microscopia de luz.

3.3. Imunoistoquímica para identificação de marcadores de morte celular

Os cortes histológicos coletados em lâminas silanizadas foram submetidos a banhos sucessivos de xilol e reidratados. Em seguida, submetidos às seguintes etapas de lavagens e incubações sob agitação a 20 rpm, descritas resumidamente: a) três lavagens de 10 minutos em tampão fosfato de sódio (PBS), pH 7,4, 0,1M, a temperatura ambiente; b) inibição da peroxidase endógena com 0,3% de H₂O₂ por 60 minutos em metanol; c) lavagens em PB à temperatura ambiente; d) recuperação antigênica com Diva Decloaker 100x (Biocare Medical) em panela pressurizada, durante 25 minutos; e) lavagens em PB à temperatura ambiente; f) bloqueio com avidina e biotina por 60

minutos cada e lavagens entre eles; g) nova inibição da peroxidase endógena com 0,3% de H₂O₂ por 10 minutos em metanol; Load PBS 0,1 molar ph 7,4, 3% de albumina de soro bovino e triton x-100 incubação por 24 horas a temperatura ambiente, com um dos seguintes anticorpos primários, anti-caspase 3 (1:100, 9664, Cell Signaling Technology, USA) dilu dos em solu o contendo , de triton - Tween-20 (Sigma), soro normal de cabra albumina de soro bovino - BSA (1:200, Sigma) e PB; e) duas lavagens de 10 minutos em PB a temperatura ambiente; g) incubação por 1 hora, em uma solução contendo anticorpo secundário biotilado universal obtido em suino (LSAB kit, K0679, Dako laboratories, EUA), 0.3% de triton X-100, soro normal de cabra e PB; h) duas lavagens de 10 minutos em PB a temperatura ambiente; j) duas lavagens de 10 minutos em PB a temperatura ambiente; l) revelação com uma solução de incubação contendo diaminobenzidina e intensificadores (LSAB kit, K0679, Dako laboratories); bloqueio da reação com lavagens em água destilada seguido de lavagens em Tampão fosfato de potássio em salina (KPBS).

Após esses procedimento, os cortes histológicos foram desidratados em soluções crescentes de alcoóis, diafanizados em xilol e montados com meio de montagem e lamínulas.

3.4 - Forma de análise dos cortes histológicos

Um número de três cortes de cada amostra, com uma distância de 40 μm entre eles, foi selecionado para avaliar o processo de reparo do ligamento periodontal e suas mudanças relacionadas durante o período de estudo.

Os cortes histológicos foram analisados em campo claro com o auxílio de um microscópio Aristoplan (Leica - Aristoplan, Alemanha) acoplado a uma câmera digital AxioCam MRc (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Alemanha). Os campos visuais da maxila de cada animal foram coletados com objetivas de 4x e 100x através do programa de software Axiovision Rel 4.0 (Carl Zeiss, GmbH, Alemanha), alterando as variáveis de brilho e contraste de modo a realçar as células e tecidos.

3.5-Análise histológica qualitativa e quantitativa

Para a análise dos dados as imagens foram processadas no programa de análise de imagens ImageJ (National Institutes of Health, EUA) e a mensuração foi realizada em pixel. Foi avaliada a espessura do ligamento periodontal nos terços cervical, médio e apical; porcentagens relativas do perfil de reabsorção e anquilose da porção distal da raiz mesial do primeiro molar superior direito, em um aumento de 4x. Bem como, o número total de células, porcentagem da área do perfil celular, matriz extracelular, substância amorfa e vasos sanguíneos do terço cervical porção distal da raiz mesial do primeiro molar superior direito, em um aumento de 100x (Figuras 2, 3, 4 e 5).

3.6-Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa estatístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 20,0, considerando $p < 0,05$ como significante. Para detectar diferenças significativas entre os grupos durante os períodos de estudo, os dados foram comparados por meio da análise de variância (ANOVA), Kruskal-Wallis e Bonferroni como teste post-hoc.

RESULTADOS



4. RESULTADOS

Período de 1 dia pós-operatório

No período de 1 dia pós-operatório foi observado a ruptura do ligamento periodontal e da junção dento-gengival, em sua posição central, resultando em uma área de extravasamento sanguíneo, com substancial formação de uma rede de elementos de coagulação (Figura 6a). Foi estatisticamente significativa o aumento da área de perfil nuclear nos grupos infra e supraoclusão quando comparados ao grupo controle total (Gráfico 1). Além disso, foi observada a presença de área hialina decorrente da degradação do colágeno na região de ruptura (Figura 6a). Áreas de ligamento periodontal com características histológicas de normalidade foram observadas associadas às superfícies radiculares e ao osso alveolar propriamente dito (Figura 6b).

A espessura do ligamento periodontal (LPD) do terço cervical dos dentes reimplantados, apresentou um aumento significativo da espessura em todos os grupos teste (oclusão normal, infraoclusão, supraoclusão) quando comparados ao grupo naive (Gráfico 2). No entanto, nos terços médio e apical o aumento da espessura do LPD nos grupos experimentais não apresentou uma diferença estatisticamente significativa quando comparados ao naive em sua maioria, predominando uma maior espessura no grupo de supraoclusão.

Período de 3 dias pós-operatório

Todos os grupos experimentais neste período (oclusão normal, infraoclusão e supraoclusão) exibiram um processo inflamatório na fase crônica, principalmente nas regiões periapical (Figura 7a) e cervical. Foi possível ainda observar áreas de hialinização na região central do ligamento periodontal, entretanto a maior parte do ligamento periodontal apresentou a matriz extracelular fibrilar em fase de reparo com fibras colágenas de pequeno diâmetro, posicionadas de maneira desorganizada e presença de espaços extracelulares de matriz extracelular não fibrilar (Figura 8a) (Gráficos 5 e 6).

A superfície do osso alveolar demonstrou uma intensa presença de células da linhagem clástica que também são visualizados nos espaços medulares que estão mais volumosos, principalmente no septo interradicular (Figura 7b). Aparentemente, os animais do grupo infraoclusão apresentaram processo inflamatório menos intenso em relação aos demais grupos experimentais.

Período de 5 dias pós-operatório

Todos os grupos experimentais exibiram ligamento periodontal ainda em processo de reparo, com fibras colágenas de maior diâmetro, posicionadas de maneira mais organizada (Figura 8b).

O terço cervical apresentava poucas áreas de processo inflamatório evidenciadas principalmente nos grupos oclusão normal e supraoclusão, bem como na junção dento-gengival. Nesta fase torna-se mais evidente a presença de células clásticas na superfície radicular demonstrando processo de reabsorção radicular ativa (Figura 9a)

(Gráfico 7), além da presença destas células no osso alveolar. Vale ser ressaltado que os espaços medulares do osso alveolar estão mais amplos, resultando em trabéculas ósseas isoladas das demais partes do osso alveolar (Figura 9b).

Período de 7 dias pós-operatório

Os animais do grupo infraoclusão exibiram uma menor presença de células clásticas em áreas de reabsorção externa da raiz e do osso alveolar quando comparado aos demais grupos experimentais (Gráfico 7). O osso alveolar interradicular exibia características histológicas de normalidade, sem considerável presença de espaços medulares. Observou-se intensa proliferação de tecido ósseo, estreitando o espaço do ligamento periodontal, e raramente algum processo de anquilose (Figura 9c) (Gráficos 2, 3 e 4).

Houve uma oscilação na porcentagem da área de vasos sanguíneos em todos os grupos experimentais; entretanto as porcentagens totais desse elemento tecidual foram desprezíveis (menos que 0,15% da área total) (Gráfico 6). Os animais dos grupos oclusão normal e supraoclusão exibiram ligamento periodontal com espessura considerável (Gráficos 2 e 3). Áreas de reabsorção radicular externa foram comuns no terço apical da raiz e, ocasionalmente, presença de inflamação crônica no terço cervical do periodonto. Nos grupos experimentais foi observado que o osso alveolar interradicular apresentou uma considerável presença de espaços medulares, mantendo isoladas algumas trabéculas ósseas sem continuidade com o restante do osso alveolar ou basal.

Período de 14 dias pós-operatório

Os animais dos grupos experimentais exibiram ligamento periodontal com condições de normalidade (Gráficos 2, 3 e 4), com um ou outro animal mostrando áreas isoladas de inflamação crônica. O processo de reabsorção da superfície dentária foi mais evidente nos animais dos grupos infraoclusão e supraoclusão (Gráfico 4). O osso alveolar da região interradicular exibiu a presença de espaços medulares mais discretos em relação aos períodos pós-operatórios anteriores dos grupos oclusão normal e infraoclusão.

No grupo infraoclusão, a principal característica experimental foi à presença de intensa osteogênese do osso alveolar fasciculado, determinando um estreitamento da espessura do ligamento periodontal (Gráficos 2, 3 e 4), com algumas áreas de anquilose, principalmente no terço apical radicular (Gráfico 9). Além disso, pode ser observada uma tendência na diminuição da porcentagem de área de perfil celular, que inicia em 14 dias e permanece até aos 30 dias (Gráfico 10).

Período de 21 dias pós-operatório

Os animais deste grupo mostraram uma maior variabilidade histológica intragrupal. Alguns animais que não exibiam sinais de processo inflamatório crônico mostraram um processo de anquilose principalmente no terços médio e apical entremeado por área de reabsorção radicular e regeneração em todos os grupos

experimentais. O reparo do ligamento periodontal apresenta-se evoluído com a presença de matriz extracelular fibrilar discreta, células semelhantes a fibroblastos com nítida polarização celular e disposição paralela a organização da matriz extracelular fibrilar (Figura 8c).

Por outro lado, vários animais mostraram um processo de degeneração do periodonto (Gráfico 6) com bolsas periodontais com origem na região interdentária (face distal do primeiro molar), associadas com intensa reabsorção do osso alveolar acometendo o septo interradicular (Figura 10a).

Período de 30 dias pós-operatório

Nos períodos de 21 e 30 dias existiu uma semelhança entre a espessura do ligamento periodontal em todos os grupos, no terço cervical (Gráfico 2).

Neste período pós-operatório, a tendência observada anteriormente foi mantida, ou seja, na persistência da bolsa periodontal a reabsorção do periodonto atingiu um grau severo, principalmente nos animais do grupo supraoclusão, com exfoliação dental completa (Figura 10b).

Entretanto, os animais que mantiveram um padrão de normalidade do periodonto, exibiram ligamento periodontal com discreta diminuição do diâmetro e elevado grau de anquilose nos grupos oclusão normal e infraoclusão (Gráfico 9), também entremeado com áreas de reabsorção radicular e neoformação. Foram observadas diferenças estatisticamente significantes na reabsorção dentária do grupo infraoclusão com os demais grupos experimentais (Gráfico 7), apresentando maior reabsorção que o grupo oclusão normal e menor que o grupo supraoclusão. É interessante salientar que áreas de hipercementose foram evidentes.

Período de 45 dias pós-operatório

Neste período pós-operatório, a tendência observada nos dois períodos experimentais anteriores também foi mantida. Os animais com periodonto exibindo processo inflamatório revelaram uma situação crítica, com vários casos de adiantado processo de exfoliação dentária ou mesmo ausência do elemento dentário, principalmente no grupo supraoclusão. Áreas de sequestro ósseo associado ao processo de exfoliação dentária foram comuns, com presença de inflamação aguda e formação de material necrótico.

Por outro lado, os animais com discreto ou mesmo ausência de processo inflamatório associado ao elemento dentário exibiram áreas de reabsorção radicular e neoformação óssea, com rara situação de anquilose (Figura 10c). As áreas de reabsorção apresentaram um aumento significativo em todos os grupos experimentais quando comparados ao período de 30 dias (Gráfico 7).

Grupo de 60 dias pós-operatório

Neste período pós-operatório, a tendência observada anteriormente foi respeitada. Assim sendo, animais com inflamação periodontal em processo avançado ou elevado índice de exfoliação dentária serão perdidos em pouco tempo. Dentre estes animais, aqueles do grupo infraoclusão exibiam processo de reabsorção dentária menos avançada (Figura 10d); enquanto os animais do grupo supraoclusão exibiram processo de reabsorção mais severo entre os grupos experimentais, com elevada taxa de exfoliação dentária completa (Gráfico 7).

Por outro lado, os animais cujo processo inflamatório não exibia um sensível grau de severidade, mantiveram a tendência de reabsorção radicular, com menor grau de anquilose. É interessante ressaltar que mesmo nestes animais, um processo inflamatório na região interdentária (face distal do primeiro molar) mostrou sinais de avanço, ocasionalmente associado a uma bolsa periodontal (Figura 10d).

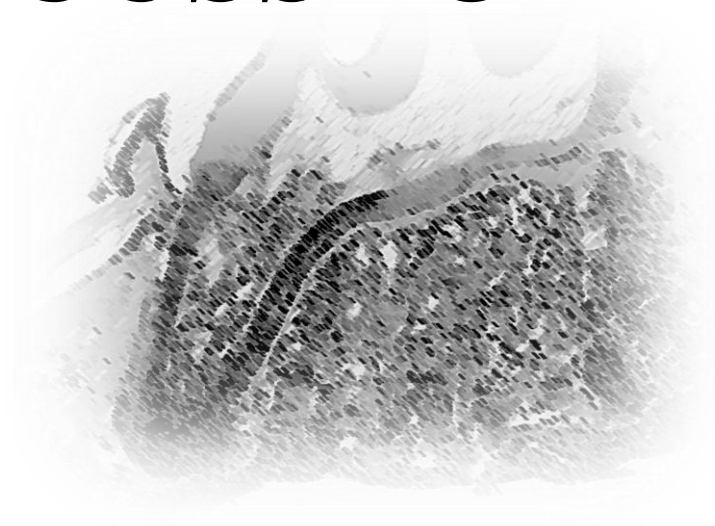
Análise imunoistoquímica

A expressão da proteína caspase-3 foi evidenciada como uma marcação homogênea do citoplasma das células periodontais (Figura 11a-c). Este mesmo padrão de marcação pode ser confirmado nas regiões de medula óssea vermelha, entretanto, com marcação mais intensa (Figura 11d); além da marcação dos odontoblastos em polpa em processo inflamatório difuso (Figura 11e) e, ocasionalmente em osteoclastos (Figura 11b). Invariavelmente, a expressão de caspase-3 nos cementócitos foi um indicador adequado para revelar se a reabsorção radicular seria um processo subsequente (Figura 11a). Neste ponto, pode ser destacado que a expressão de caspase-3 nos cementócitos coincidiu com as fases em que a reabsorção radicular estava mais intensa. Entre as células presentes no espaço do ligamento periodontal, os cementoblastos mostraram marcação nítida na maior parte dos cortes histológicos (Figura 11c). Entretanto, a marcação de caspase-3 em fibroblastos foi discutível e de difícil visualização, não permitindo uma análise consistente, devido uma marcação de fundo acentuada.

A comparação da marcação de caspase-3 entre os grupos ficou prejudicada em virtude de alguns casos apresentarem discreta marcação, enquanto outros exibiram grande marcação o “background”. No entanto, existe uma tendência de um aumento na

quantidade caspase-3 nas células da linhagem cementoblástica após o primeiro dia de pós-operatório até o sétimo dia de pós-operatório. Em prosseguimento a expressão de caspase-3 é dependente da presença ou ausência de processo de reabsorção radicular. Vale ser ressaltado que no grupo controle total, raramente foi observada a expressão de caspase-3 nas células do ligamento periodontal.

DISCUSSÃO



5. DISCUSSÃO

As alterações do ligamento periodontal frente à carga oclusal no processo de reparo de molares de ratos que sofreram reimplante imediato foram estudadas em um modelo animal estabelecido. A hipótese nula de que o reparo do ligamento não seria afetado significativamente pela intensidade da força oclusal foi rejeitada.

Limitações do estudo

A técnica cirúrgica utilizada (Kvinnnsland et al., 1991) para promover a extração e reimplante imediato de molares de ratos necessita de considerações quanto a alguns parâmetros que podem ter interferido nos resultados do presente trabalho de pesquisa²³. A dificuldade de execução é inata, além de apresentar restrita condição de avaliação do seu sucesso no momento imediato a sua execução.

Para realizar a avulsão dentária indica-se a luxação do dente com ponto de apoio na distal do mesmo. Esta prática provavelmente aumenta de forma considerável a incidência de fratura radicular (raízes mesial e intermédia-vestibular). No entanto, as fraturas radiculares somente foram confirmadas durante análise histológica. Desta forma, pode ser sugerida uma modificação da técnica proposta, onde se inicia a luxação com apoio na distal e, executa um deslocamento no sentido vestibulo-palatino com discreta rotação mesio-oclusal.

A idade do animal também influencia no sucesso da técnica empregada, pois a rizogênese incompleta facilita a luxação e avulsão dentária, uma vez que as fibras

colágenas estão imaturas. Portanto, quanto maior a resistência encontrada para a avulsão dentária, maior serão os danos causados no periodonto.

Os dois padrões de reparo encontrados durante o estudo, sendo eles inflamação crônica e processo de reparo normal, também podem ser provocados pela ausência de contenção após o reposicionamento do dente, provavelmente pela grande liberdade de movimentação frente às forças oclusais ou extrusão pela ausência de contato interdental. Além disto, a presença de bolsas periodontais crônica com diferentes graus de severidade na distal dos dentes avulsionados (em todos os grupos) pode ser decorrente do trauma causado pelo extrator na distal do dente durante a luxação inicial.

A contenção mais indicada na literatura para a contenção de molares de roedores é aquela realizada com aplicação de adesivo à base de metacrilato¹⁰. Mesmo não havendo discussão específica sobre a técnica, é possível que isto aumente o tempo operatório visto a necessidade de controle de sangramento e umidade da área. No entanto, deve ser mencionado que tal procedimento de aplicação de adesivo pode induzir o acúmulo de placa bacteriana e dificuldade de reparo do tecido gengival.

A grande maioria dos estudos a respeito de dentes reimplantados em ratos utilizam os incisivos centrais como modelo²⁴; no entanto, no presente estudo, utilizamos primeiros molares superiores. Esta diferença de modelo experimental limita a comparação com alguns estudos previamente apresentados visto que os incisivos centrais são dentes de crescimento contínuo, devido a presença de uma bainha epitelial apical que permite a proliferação e diferenciação contínua de células das linhagens fibroblásticas, cementoblástica e osteoblásticas. Disso posto, a capacidade de reparo do periodonto nos incisivos é consideravelmente elevada quando comparada com os molares.

Influência da carga oclusal no processo de reparo do ligamento periodontal de dentes reimplantados

O ligamento periodontal de humanos apresenta uma espessura que varia entre 0,2 e 0,4mm e é constituído por células, vasos e matriz extracelular fibrilar e não fibrilar. Na absorção ou distribuição das forças aplicadas sobre o dente deve-se considerar a variabilidade na espessura da lâmina dura, densidade do osso alveolar e ainda a viscoelasticidade do ligamento periodontal; variável ao longo dos vários pontos da superfície radicular uma vez que esta é dependente da quantidade de vasos sanguíneos e outros elementos da matriz extracelular²⁵.

Frente ao trauma oclusal, há um estreitamento mecânico inicial do ligamento periodontal. Em prosseguimento, é observado um aumento na espessura do ligamento periodontal, devido à reabsorção do osso alveolar, na tentativa de regularizar o espaço periodontal¹⁰. Já a ausência de contato oclusal, pode provocar uma diminuição na espessura do ligamento periodontal por atrofia ou aumento na formação de osso, resultando em processos de anquilose em alguns casos²¹. Neste estudo, a avulsão e reimplante dental influenciaram mais na espessura do ligamento periodontal que o trauma oclusal, em período inicial, provavelmente devido a movimentação dentária. No entanto, no quinto dia foi observado um estreitamento na espessura do ligamento periodontal no grupo infraoclusão com reparo mais avançado; enquanto nos grupos onde foi mantida a carga oclusal a espessura do ligamento periodontal é praticamente mantida.

Na indução de morte celular, áreas de hialinização extensas e desorganização excessiva podem atrasar o processo de reabsorção óssea na face periodontal da lâmina dura. A regeneração tecidual apresenta evolução favorável quando as áreas hialinas e de necrose são reabsorvidas. Necessita-se, ainda, um mínimo de organização tecidual, para que ocorram as interações celulares necessárias, e uma boa vascularização para alcançar um suporte metabólico favorável para o reparo tecidual ²⁵.

A integridade da matriz extracelular (MEC) é essencial para manutenção da estrutura e função normal dos tecidos de conexão, por emitir sinais para as células regulando todos os aspectos do seu fenótipo; de morfologia a diferenciação. Altos níveis de (MEC) aparecem durante do desenvolvimento, reparo de feridas ou doenças ⁹.

A quantidade de células do ligamento periodontal foram maior nos grupos que mantiveram o contato oclusal imediato ou após 7 dias do reimplante, quando comparados ao grupo sem contato oclusal, sugerindo que o estímulo oclusal estimula o reparo do ligamento periodontal, prevenindo a anquilose dentoalveolar, enquanto uma força oclusal excessiva pode causar severa reabsorção do osso e raiz dentária ²⁶.

Após o reimplante de molares de ratos, a presença de células em proliferação (PCNA- células positivas) e apoptose (TUNEL-células positivas) acontece de modo inversamente proporcional quando se compara a porção do ligamento periodontal próxima do osso e da raiz. No 1° e 5° dia a proliferação celular (5 a 42%) estava aumentada na porção do ligamento periodontal próxima do osso alveolar, diminuindo gradativamente por volta do 7° dia (), com uma diferença estatisticamente significativa. Já as células em apoptose (2,5 a 4%) estavam mais expressivas no ligamento periodontal próximo a raiz no 1° dia e próximo ao osso no 5° e 7° dia ¹⁰. Estímulos traumáticos; como avulsão, movimentação ortodôntica, trauma oclusal; no

ligamento periodontal podem aumentar estas porcentagens em até seis vezes, quando comparado com condições normais ¹⁰.

O processo de avulsão e reimplante dental expõe as células do ligamento periodontal próxima da raiz a hipóxia, contribuindo para a apoptose celular; fato este que possivelmente explica os resultados encontrados na presença de caspase-3 nos cementócitos.

Já a diminuição da proliferação celular próxima ao osso que apresenta um aumento inicial e uma queda no 7° dia pode ser explicada por dois motivos: . Diferenciação das células do ligamento em células osteogênicas; uma vez que a diferenciação celular e mudanças na função ocorrem após a proliferação celular das células mesenquimais indiferenciadas; ou 2. Manutenção do espaço do ligamento periodontal ¹⁰.

A ausência de contato oclusal favoreceu o reparo do ligamento periodontal no período inicial (1° ao 7° dia), no entanto, no 4° dia apresentou mais anquilose quando comparado com os outros grupos estudados. Nos ratos com supra e infraoclusão, foi observado uma dinâmica semelhante na sequência do processo de reparo, onde a reabsorção dentária não se mantém ativa constantemente, havendo o aparecimento de anquilose dentária intermitente a estes períodos. Como observado neste estudo, um estímulo oclusal apropriado previne anquilose dento-alveolar ^{19,20} e a reabsorção radicular em molares de ratos reimplantados, provavelmente pelo aumento da proliferação de fibroblastos ²⁰.

Em síntese, foi possível observar que após o reimplante dentário, independente do grupo experimental, os animais se dividem com dois aspectos histológicos de

evolução temporal: a) reimplante dentário associado a um processo inflamatório crônico; b) reimplante dentário com discreto ou isento de processo inflamatório crônico.

Os animais com reimplante que exibiram um discreto ou ausência de processo inflamatório crônico apresentaram periodonto em processo de regeneração, sendo este processo mais rápido nos animais do grupo oclusão normal. Em seguida, há uma tendência de redução do diâmetro do ligamento periodontal com subsequente aparecimento de anquilose e áreas de reabsorção radicular. Aparentemente, este processo será contínuo e terá como consequência o aparecimento de uma bolsa periodontal (distal), como notado nos animais com 60 dias de pós-operatório dos grupos oclusão normal e infraclusão. Por outro lado, os animais que mantiveram desde o início um processo inflamatório crônico exibiram reabsorção radicular contínua sem sinais de reparação tecidual do ligamento periodontal, sendo que inúmeros animais exibiram exfoliação dental.

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

CONCLUSÃO



6. CONCLUSÃO

A carga oclusal recebida pelos dentes reimplantados interfere no processo de reparo no terço cervical do ligamento peridontal. O trauma oclusal acelera significativamente o processo de reabsorção radicular, enquanto a ausência de forças oclusais retarda o início da reabsorção radicular inflamatória. Dentes reimplantados não devem sofrer carga mastigatória oclusal precoce.

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vasconcelos, B.C.E.; Fernandes, B.C.; Aguiar, E.R.B. - Reimplante dental. Rev. Cir. Traumat. Buco -Maxilo-Facial, v.1, n.2, p. 45-51, jul/dez – 2001.
2. Andreassen JO, Andreasen FM, Andersson L. Textbook and colors atlas of traumatic injuries to the teeth. 4th ed. Oxford: Blackwell; 2007,770p.
3. Petrovic B, Marković D, Peric T, Blagojevic D. Factors related to treatment and outcomes of avulsed teeth. Dent Traumatol. 2010 Feb;26(1):52-9.
4. Poi WR; Salineiro, S.L.; Miziara, F.V.; Miziara, E.V. A educação como forma de favorecer o prognóstico do reimplante dental. Revista da APCD, v. 53, n. 6, p. 474-479. Nov/Dez. 1999.
5. Soares I.L.; Soares, I.J. Técnica do reimplante dentário – Tratamento dos dentes traumatizados e conduta clínica para reimplantação. RGO, V. 36, N. 5, P. 331-336. Set/Out. 1998.
6. Trope M. Clinical management of the avulsed tooth: present strategies and future directions. Dent Traumatol 2002; 18:1-11.
7. Gulinelli JL, Saito CT, Garcia-Júnior IR, Panzarini SR, Poi WR, Sonoda CK, Jardim EC, Faverani LP. Occurrence of tooth injuries in patients treated in hospital environment in the region of Araçatuba, Brasil during a 6-year period. Dent Traumatol. 2008 Dec; 24(6):640-644.
8. Shimono M, Ishikawa T, Ishikawa H, Matsuzaki H, Hashimoto S, Muramatsu T, Shima K, Matsuzaka K, Inoue T. Regulatory mechanisms of periodontal regeneration. Microsc Res Tech. 2003 Apr 1;60(5):491-502.

9. Hamilton DW. Functional role of periostin in development and wound repair: implications for connective tissue disease. *J Cell Commun Signal*. 2008 Jun; 2(1-2):9-17.
10. Sato K, Muramatsu T, Tsuchiya Y, Masaoka T, Enokiya Y, Hashimoto S, Shimono M. Proliferation, migration and apoptosis of periodontal ligament cells after tooth replantation. *Oral Dis* 2010;16:2.63-8.
11. Barros I, Muramoto T, Soma K. Effects of occlusal loading on alveolar bone remodeling and changes in the distribution of neuropeptides after tooth replantation in rats. *J Med Dent Sci*. 2007 Mar; 54(1):49-56.
12. Glickman I. Role of occlusion in the etiology and treatment of periodontal disease. *J Dent Res*. 1971 Mar-Apr; 50(2):199-204.
13. Rios HF, Ma D, Xie Y, Giannobile WV, Bonewald LF, Conway SJ, Feng JQ. Periostin is essential for the integrity and function of the periodontal ligament during occlusal loading in mice. *J Periodontol*. 2008 Aug; 79(8):1480-90.
14. Palcanis KG. Effect of occlusal trauma on interstitial pressure in the periodontal ligament. *J Dent Res*. 1973 Sep-Oct; 52(5):903-10.
15. Biancu S, Ericsson I, Lindhe J. Periodontal ligament tissue reactions to trauma and gingival inflammation. An experimental study in the beagle dog. *J Clin Periodontol*. 1995.
16. Glickman, I. Inflammation and trauma from occlusion: co-destructive factors in chronic periodontal disease. *J Periodontol*, V.34, p.5-10, 1963.
17. Jabôr, GM; Suchard, CA; Martins Filho, CM; Tames, DR. Efeitos do Trauma Oclusal no ligamento periodontal de Molares de ratos restaurados em resina

- composta e amálgama. *J. Bras. oclusão ATM dor orofac*; 3(10): 154-7, abr.-jun. 2003.
18. Kaku M, Uoshima K, Yamashita Y, Miura H. Investigation of periodontal ligament reaction upon excessive occlusal load--osteopontin induction among periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*. 2005 Feb; 40(1):59-66.
 19. Chen CC, Kanno Z, Soma K. Occlusal forces promote periodontal healing of transplanted teeth with enhanced nitric oxide synthesis. *J Med Dent Sci*. 2005 Mar; 52(1):59-64.
 20. Hu FW, Hosomichi J, Kanno Z, Soma K. The influence of occlusal stimuli on basic fibroblast growth factor expression in the periodontal healing of replanted teeth. *J Med Dent Sci*. 2008 Mar; 55(1):129-35.
 21. ElDeeb ME, Andreasen JO. Histometric study of the effect of occlusal alteration on periodontal tissue healing after surgical injury. *Endod Dent Traumatol*. 1991 Aug; 7(4):158-63.
 22. Faloni AP, Sasso-Cerri E, Katchburian E, Cerri PS. Decrease in the number and apoptosis of alveolar bone osteoclasts in estrogen-treated rats. *J Periodontal Res*. 2007 Jun; 42(3):193-201.
 23. Kvinnsland S, Kristiansen AB, Kvinnsland I, Heeyraas KJ. Effect of experimental traumatic occlusion on periodontal and pulpal blood flow. *Acta Odontol Scand* 1992 Aug; 50(4):211-9.
 24. Panzarini SR, Okamoto R, Poi WR, Sonoda CK, Pedrini D, da Silva PE, Saito CT, Marão HF, Sedlacek P. Histological and immunohistochemical analyses of the chronology of healing process after immediate tooth replantation in incisor rat teeth. *Dent Traumatol*. 2012 Mar 13. pag

25. Consolaro A. Tensão nas áreas de compressão do ligamento periodontal durante o movimento ortodôntico. *Rev. Clín. Ortodon. Dental Press.* 2007; 6(3): 107-11.
26. Mine K, Kanno Z, Muramoto T, Soma K. Occlusal forces promote periodontal healing of transplanted teeth and prevent dentoalveolar ankylosis: na experimental study in rats. *Angle Orthod* 2005 Jul; 75 (4):637-44.

ANEXOS



Anexo A

FIGURAS

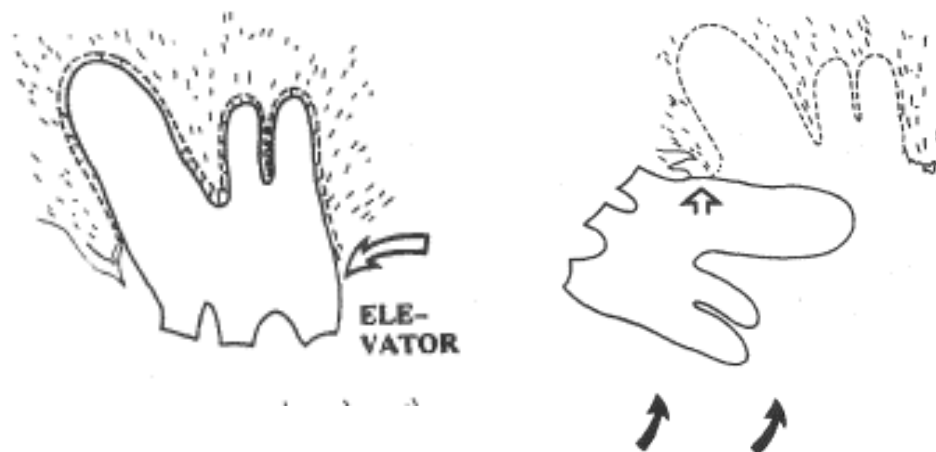


Figura 1 Apresentação esquemática da técnica de Kvinnslund (1991).

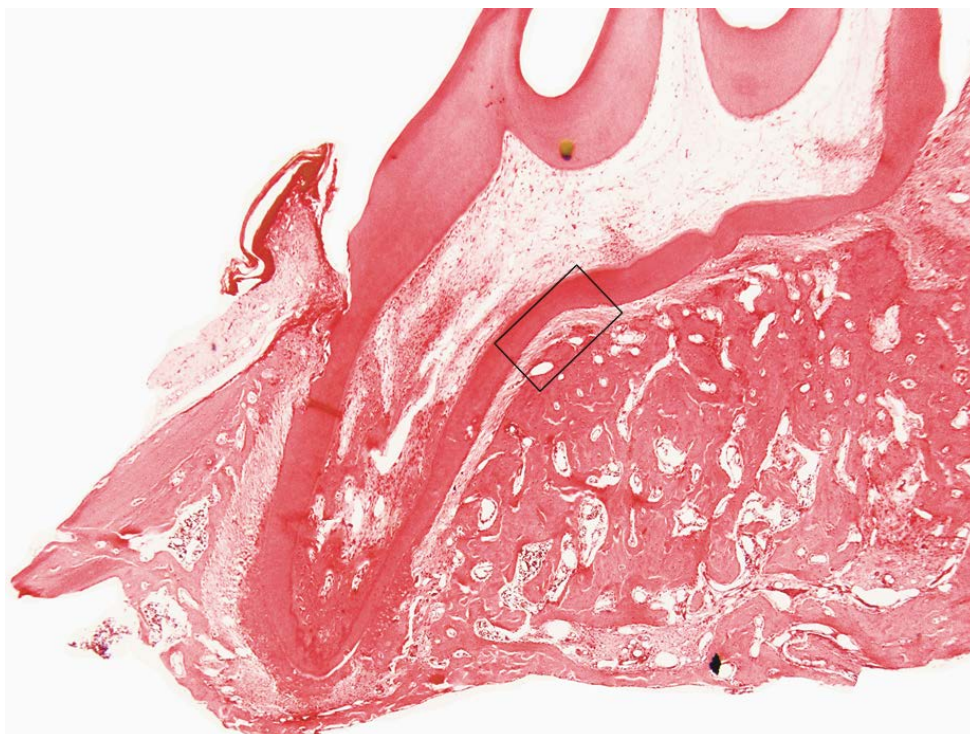


Figura 2 Apresentação do corte mesio-distal do primeiro molar superior direito. A área avaliada está indicada pelo retângulo. Barra= 400 μ m

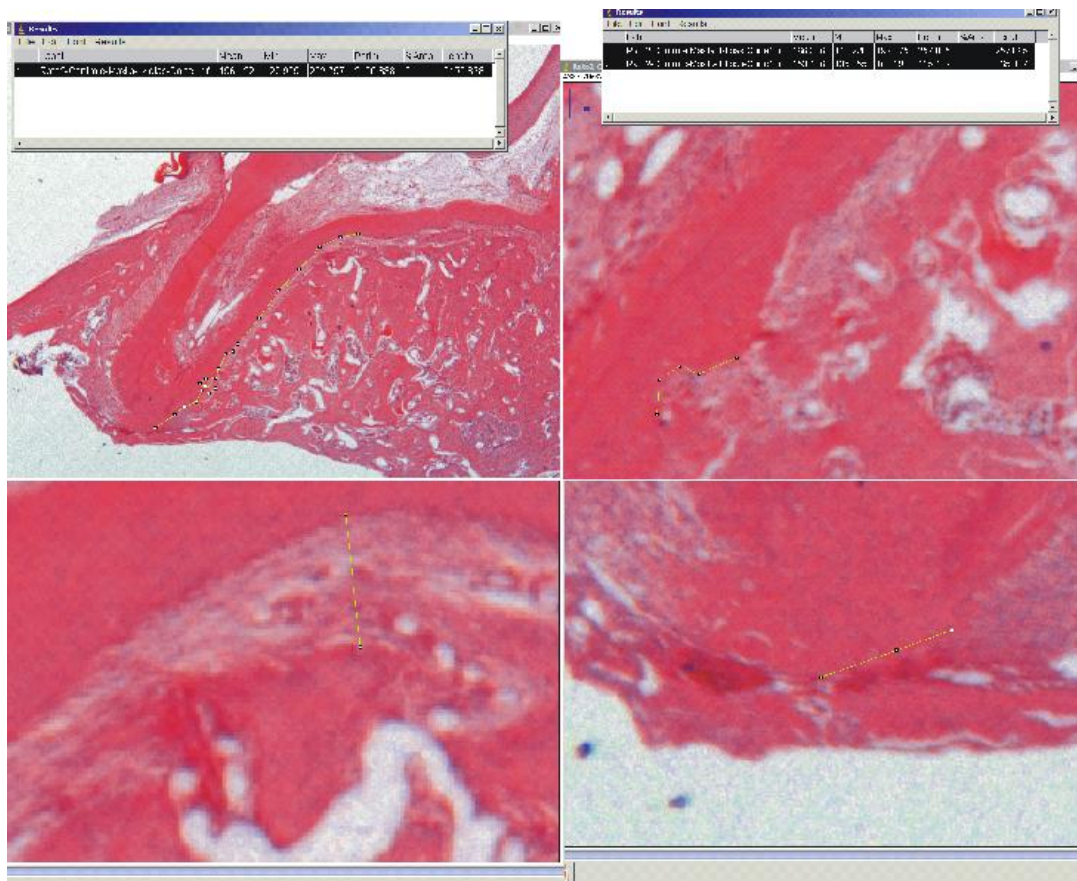


Figura 3 Quantificação no programa ImageJ do perímetro(a), área de reabsorção(b), espessura do espaço do ligamento periodontal(c), e área de anquilose(d).

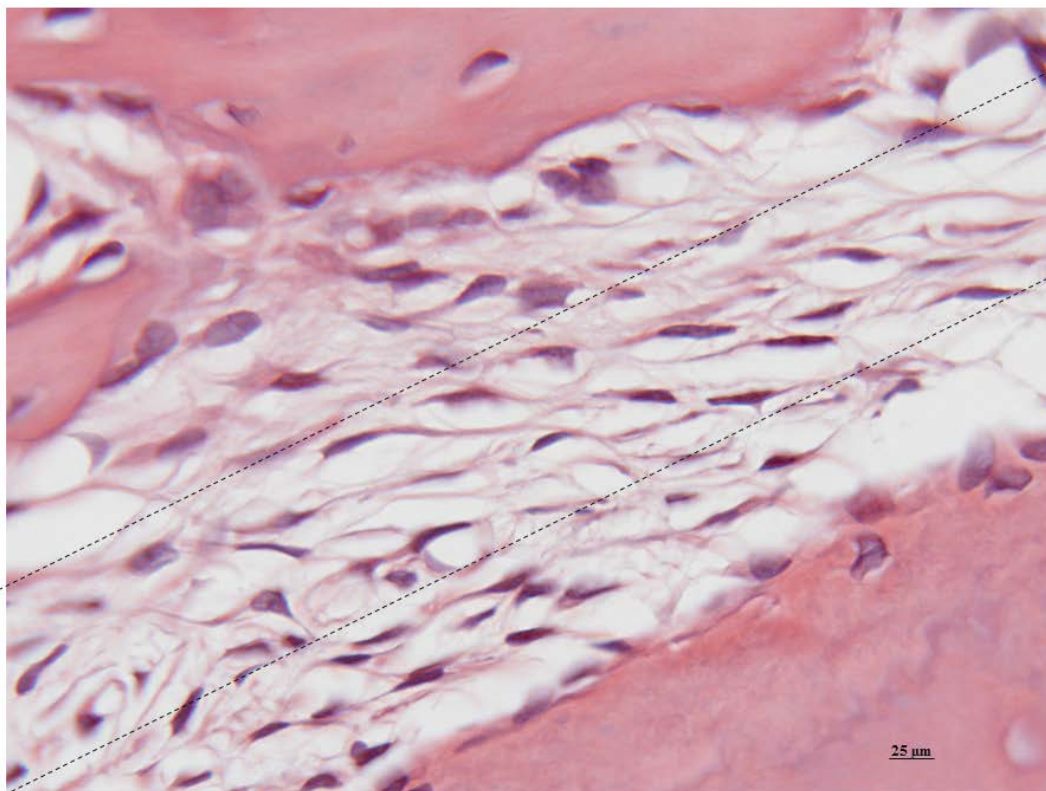


Figura 4. Apresentação do corte longitudinal do ligamento periodontal no terço cervical da raiz mesial do primeiro molar superior direito. A área avaliada está indicada pelo retângulo. Barra= 25μm

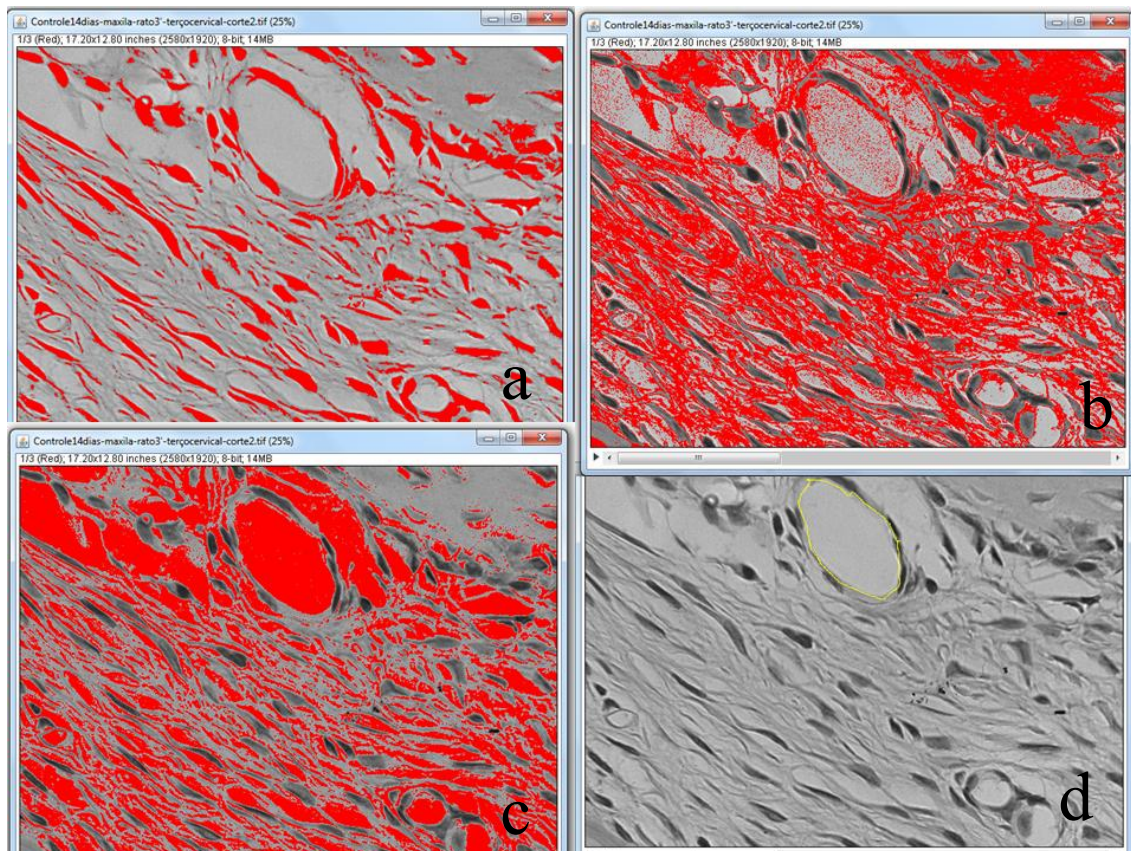


Figura 5. Quantificação no programa ImageJ da área de perfil nuclear(a), matriz extracelular(b), substância amorfa(c) e vasos sanguíneos(d).

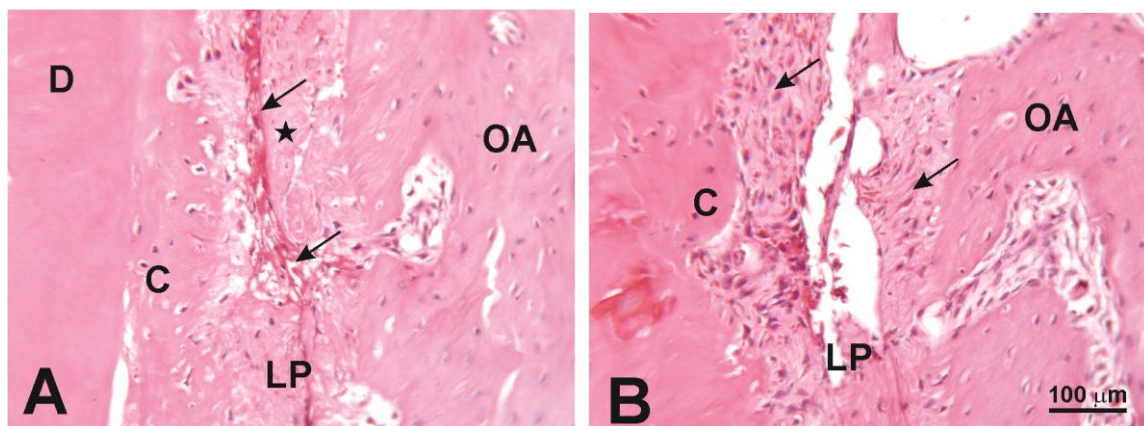


Figura 6. Fotomicrografia em microscopia de luz de corte histológico corado com hematoxilina e eosina, mostrando a o terço médio da região do periodonto do animal do grupo oclusão normal com 1 dia de pós-operatório. Em A, observar a presença de uma região intermédia do ligamento periodontal preenchido por coágulo sanguíneo (setas) e área de hialinização (asterisco). Em B, observar áreas integra de fibras colágenas inseridas no cimento ou ligamento periodontal, não exibindo hialinização do colágeno. Abreviaturas: C, cimento celular; D, dentina; LP, ligamento periodontal; OA, osso alveolar.

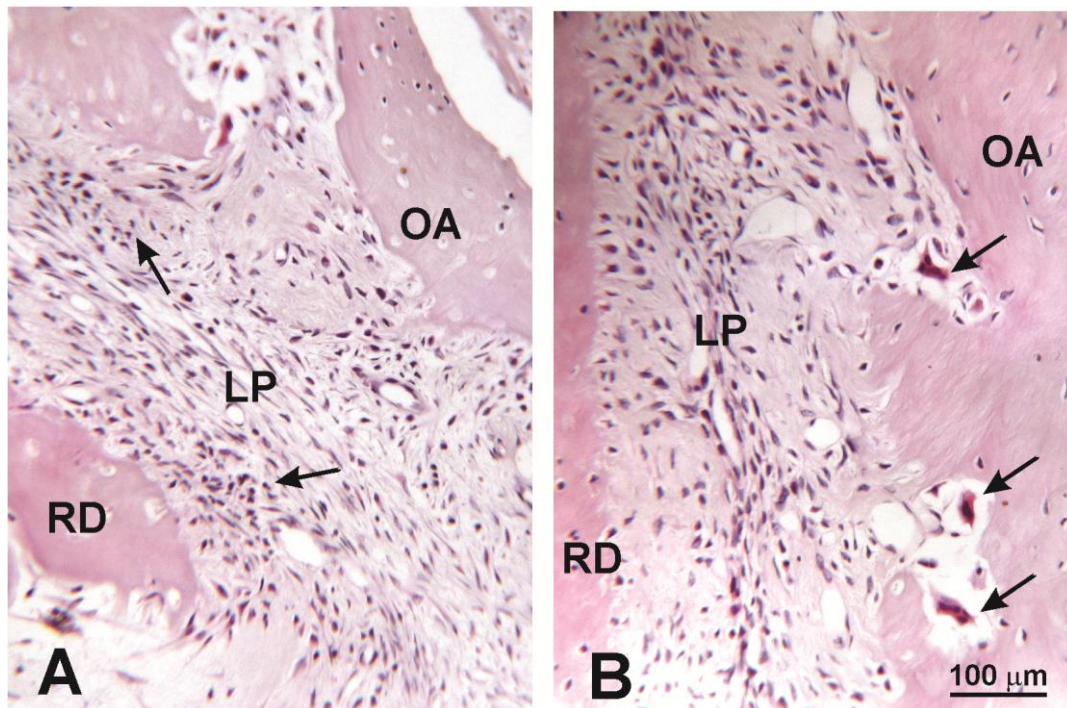


Figura 7. Fotomicrografia em microscopia de luz de corte histológico corado com hematoxilina e eosina, mostrando a o terço apical (A) e médio-apical (B) da região do periodonto do animal do grupo oclusão normal com 3 dias de pós-operatório. Em A, observar a presença de infiltrado inflamatório crônico (setas). Em B, observar áreas de reabsorção óssea ativa na superfície do osso alveolar fasciculado, com presença de células da linhagem clástica (setas). Abreviaturas: LP, ligamento periodontal; OA, osso alveolar; RD, raiz dentária.

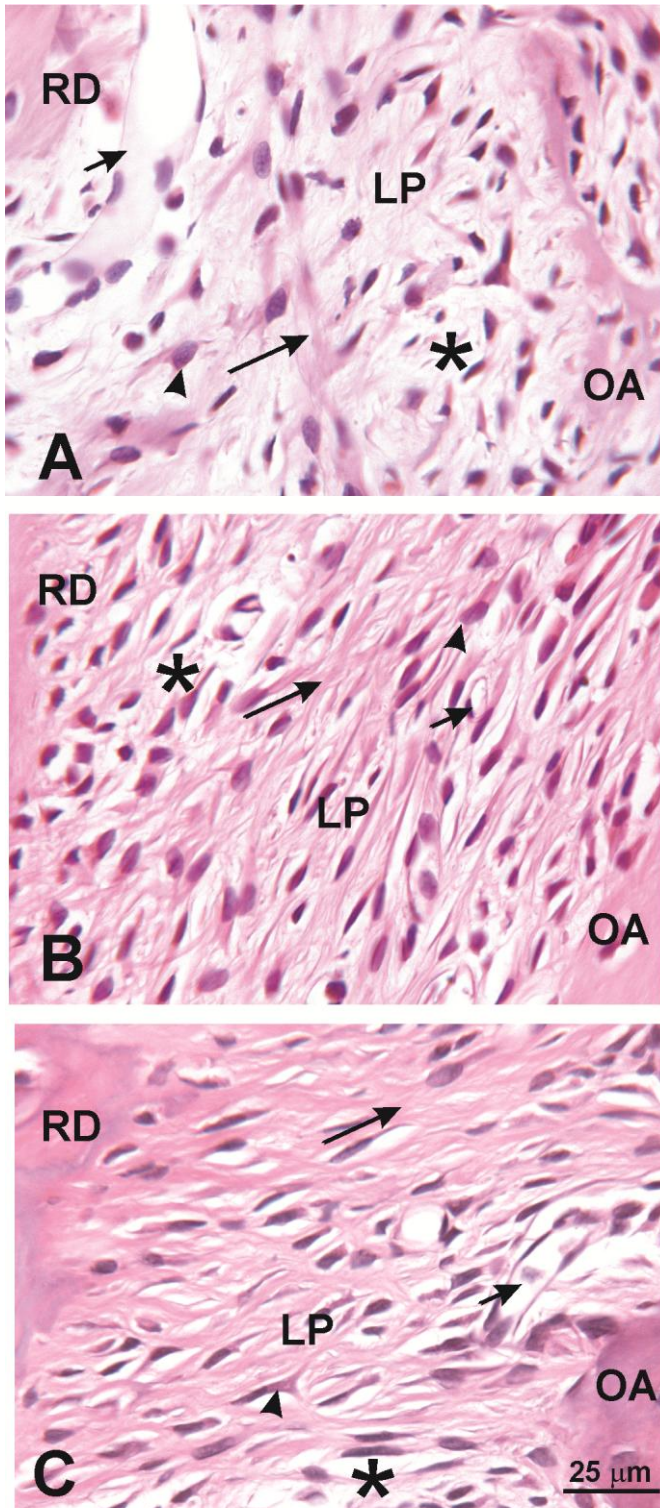


Figura 8. Fotomicrografia em microscopia de luz de corte histológico corado com hematoxilina e eosina, mostrando a região do primeiro molar superior de animais do

grupo infra-oclusão com 3 dias (A), 5 dias (B) e 21 dias (C) de pós-operatório que mostraram uma evolução favorável do reparo tecidual. Em A-C, observar a presença de matriz extracelular fibrilar (seta maior), células semelhantes a fibroblastos (cabeça de seta), vasos sanguíneos dilatados (seta menor) e matriz extracelular não fibrilar (asterisco). Em A é observado uma matriz extracelular fibrilar discreta que aumenta à medida que o processo de reparo evolui. As células semelhantes a fibroblastos mostram também uma polarização celular paralelamente a organização da matriz extracelular fibrilar (B-C).

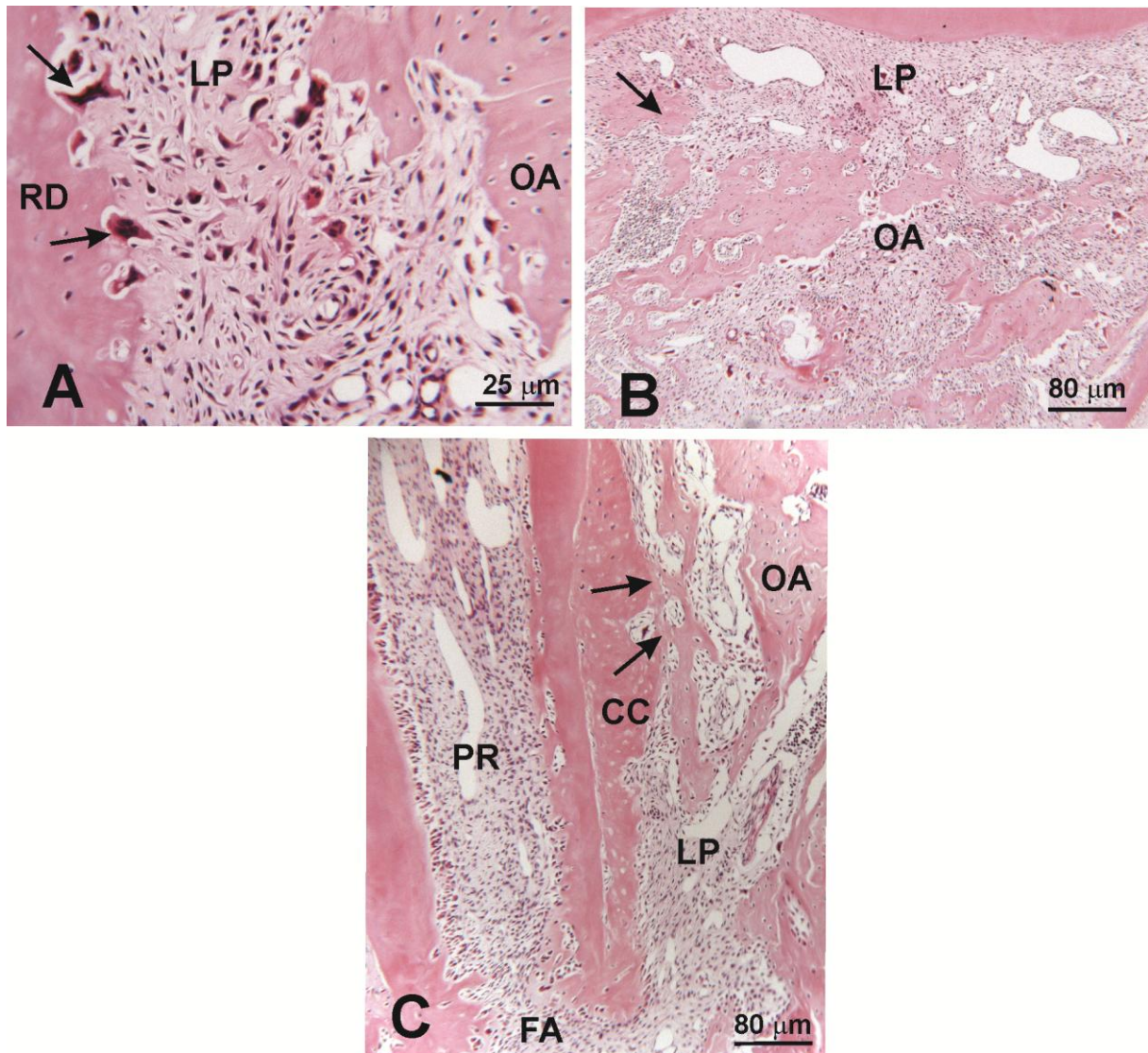


Figura 9. Fotomicrografia em microscopia de luz de corte histológico corado com hematoxilina e eosina, mostrando a o terço apical (A), septo interradicular (B) e médio-apical da região do periodonto do animal do grupo infra-oclusão com 5 dias de pós-operatório e terço médio-apical com 7 dias de pós-operatório (C). Em A, observar a presença de reabsorção radicular externa (setas), além de reabsorção do osso alveolar. Em B, observar o osso alveolar interradicular com amplos espaços medulares com algumas trabéculas isoladas (seta). Em C, observar a presença de anquilose (setas) e intensa proliferação de tecido ósseo, estreitando o espaço do ligamento periodontal.

Abreviaturas: CC, cimento celular; FA, forâmen apical; LP, ligamento periodontal; OA, osso alveolar; PD, polpa radicular; RD, raiz dentária.

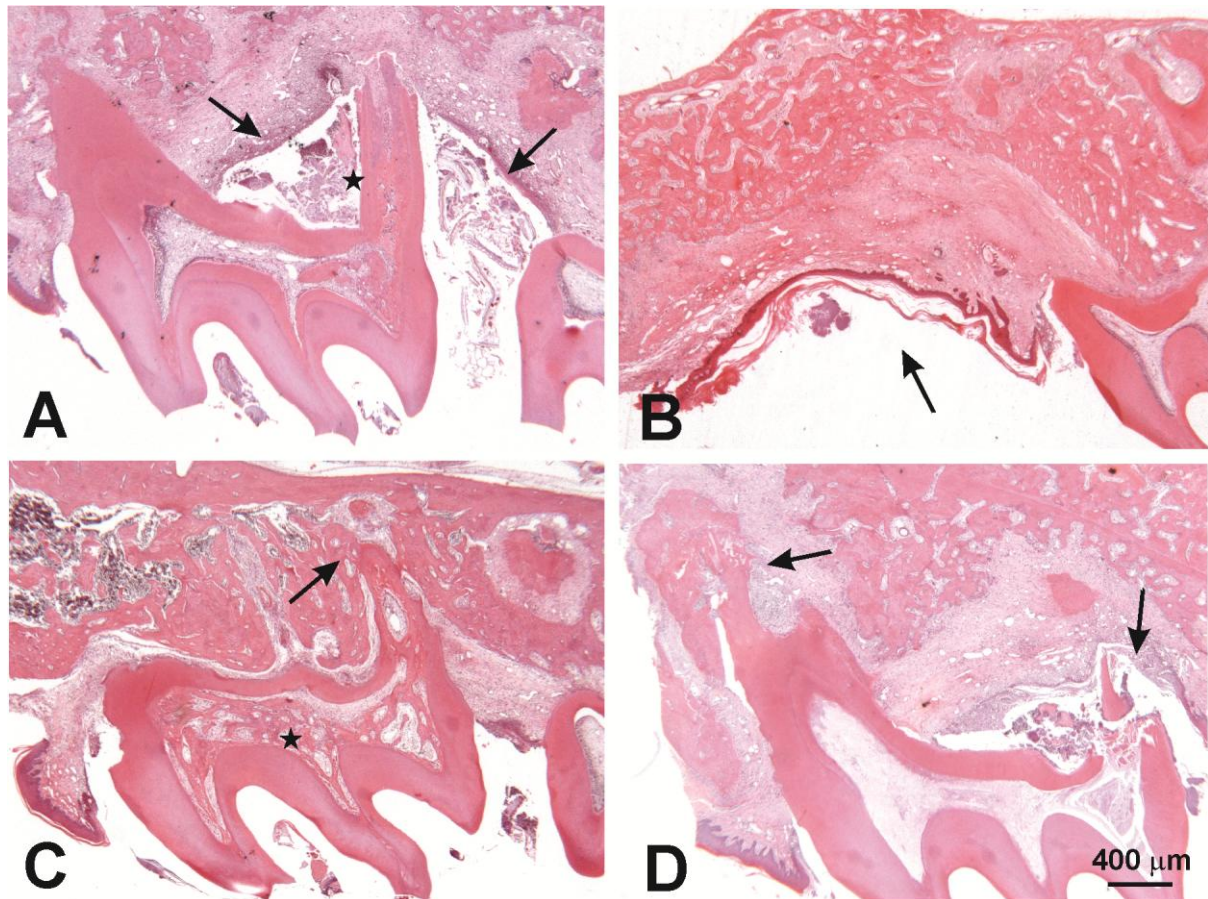


Figura 10. Fotomicrografia em microscopia de luz de corte histológico corado com hematoxilina e eosina, mostrando a região do primeiro molar superior de animal do grupo infra-oclusão com 21 dias de pós-operatório (A), supra-oclusão 30 dias (B), com 45 dias de pós-operatório do grupo oclusão normal (C) e 60 dias de pós-operatório do grupo oclusão normal (D). Em A, observar a presença de infiltrado inflamatório crônico associado com bolsa periodontal na face distal do primeiro molar (setas). Notar que a polpa dentária está com intenso processo de “ossificação” (asterisco). Em B, observar uma completa exfoliação do primeiro molar (seta). Em C, observar o periodonto em

melhores condições de normalidade; entretanto com algumas áreas de anquilose (seta).
Notar que a polpa dentária também está com intenso processo de “ossificação”
(asterisco). Em D, observar a presença de processo inflamatório crônico associado à
bolsa periodontal na fase distal do primeiro molar (seta).

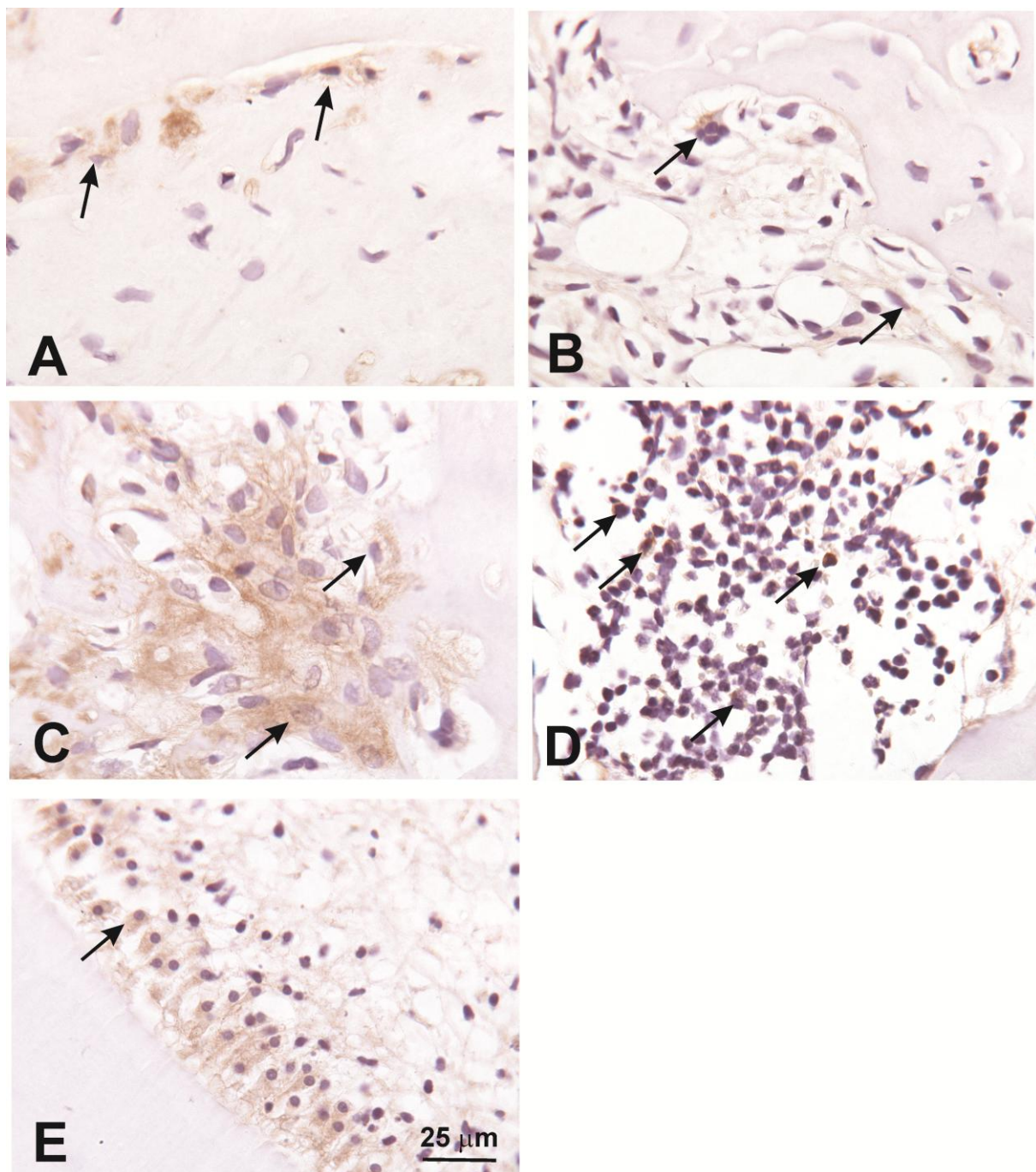


Figura 11. Fotomicrografia em microscopia de luz de corte histológico submetido à identificação da proteína caspase-3 através do método da imunoperoxidase indireta de animais do grupo oclusão normal. Em A, observar a presença de imuno-marcação no citosol de cementócitos. Em B, observar imunomarcação em célula clástica (seta superior) associada a uma trabécula óssea em processo de reabsorção e degeneração (sequestro ósseo); além da imuno-marcação em uma célula do estroma do espaço

periodontal (seta inferior). Em C, notar um aglomerado de células associado à extremidade apical de uma raiz dentária em processo de intensa reabsorção. Notar que inúmeras células (setas) do tecido conjuntivo apresentando imuno-marcação generalizada. Em D, observar a marcação de caspase-3 em células da medula óssea vermelha, revelando um padrão de imuno-marcação específica (setas). Em E, observar odontoblastos (setas) exibindo caspase-3 no citosol apical em polpa com inflamação aguda generalizada.

Área de Perfil Nuclear

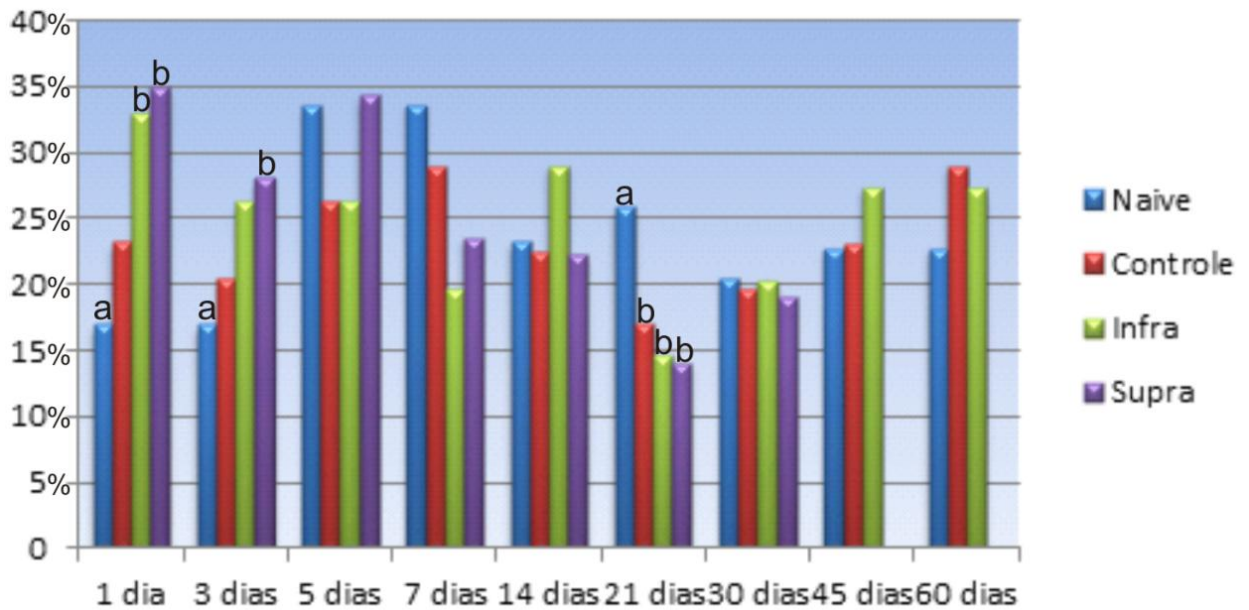


Gráfico 1- Porcentagem da área dos perfis nucleares do ligamento periodontal no terço cervical da porção distal da raiz mesial capturado com a objetiva de 100x. Diferença significativa para $p < 0,05$.

Espaço do LPD no Terço Cervical

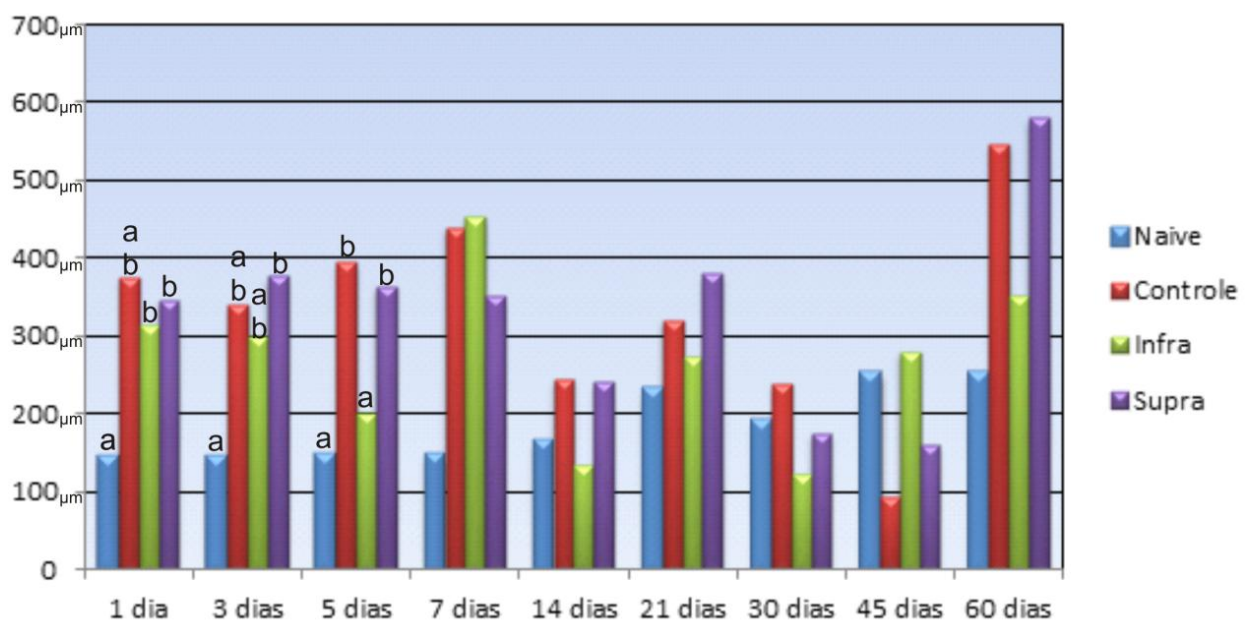


Gráfico 2- Espaço do ligamento periodontal no terço cervical da porção distal da raiz mesial capturado com a objetiva de 4x. Diferença significativa para $p < 0,05$.

Espaço do LPD no Terço Médio

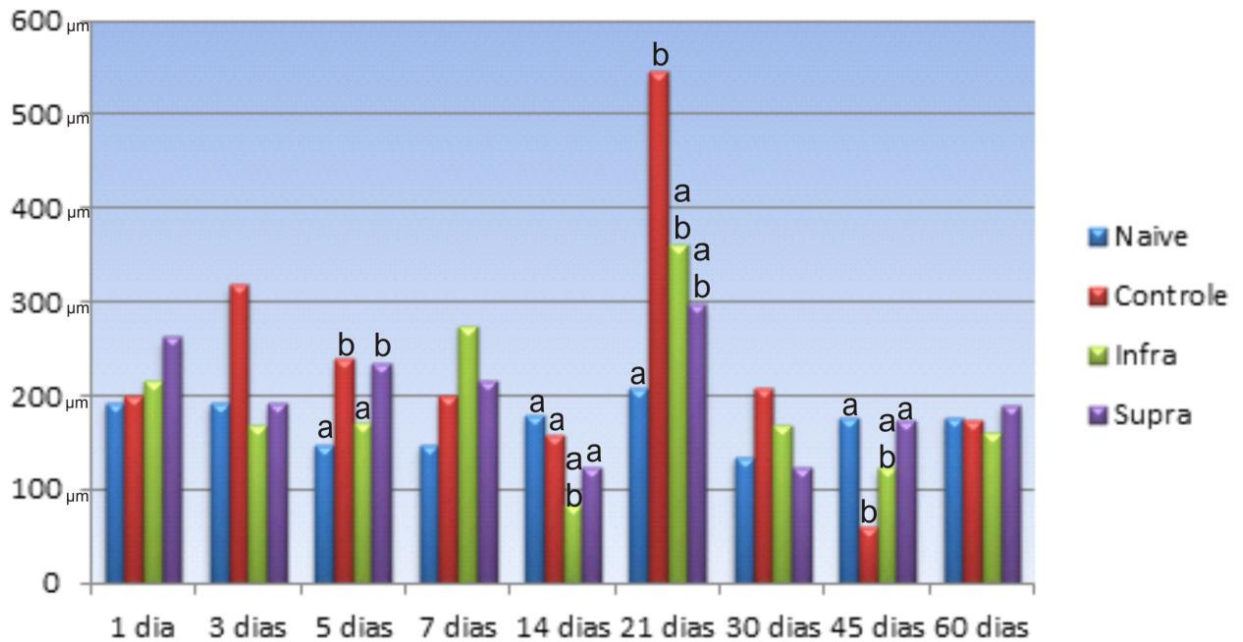


Gráfico3- Espaço do ligamento periodontal no terço médio da porção distal da raiz mesial capturado com a objetiva de 4x. Diferença significativa para $p < 0,05$.

Espaço do LPD no Terço Apical

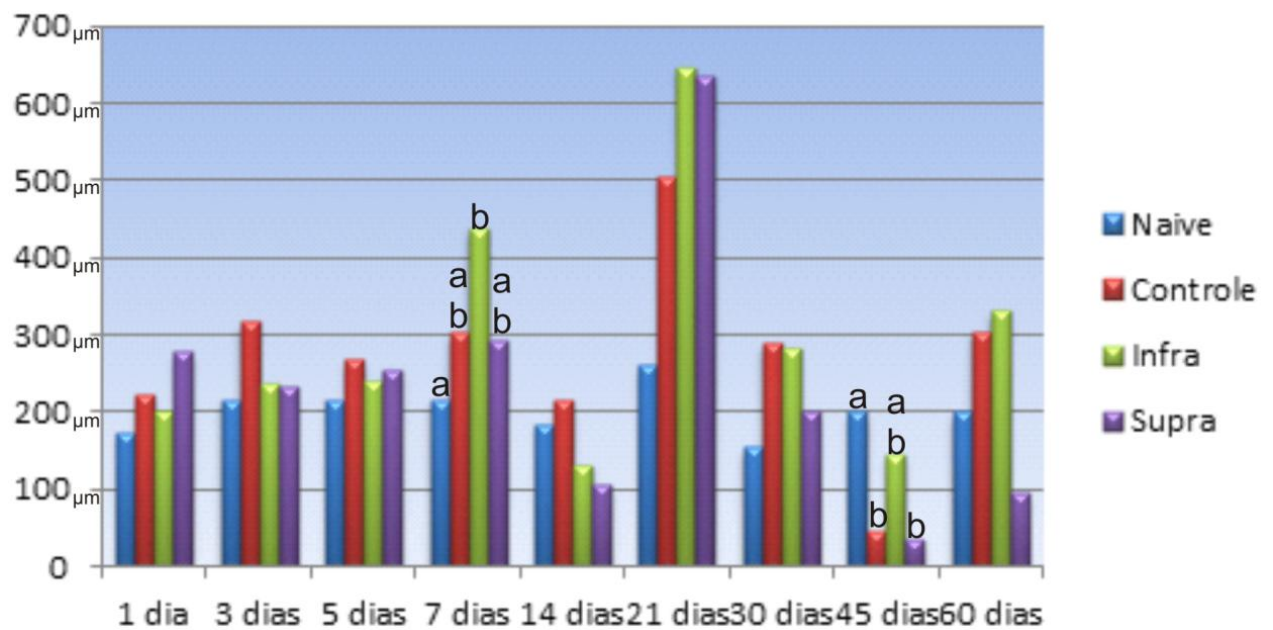


Gráfico 4- Espaço do ligamento periodontal no terço apical da porção distal da raiz mesial capturado com a objetiva de . Diferença significativa para $p < 0,05$.

Matriz Extracelular

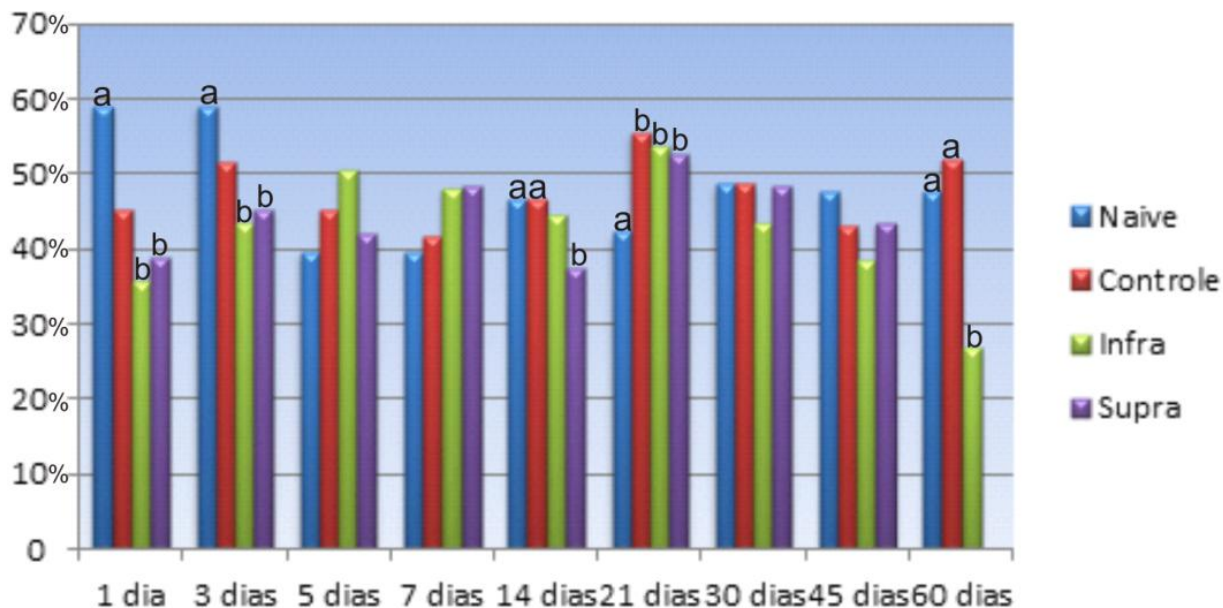


Gráfico 5- Porcentagem da área de matriz extracelular no ligamento periodontal no terço cervical da porção distal da raiz mesial capturado com a objetiva de de 100x. Diferença significativa para $p < 0,05$.

Substância Amorfa

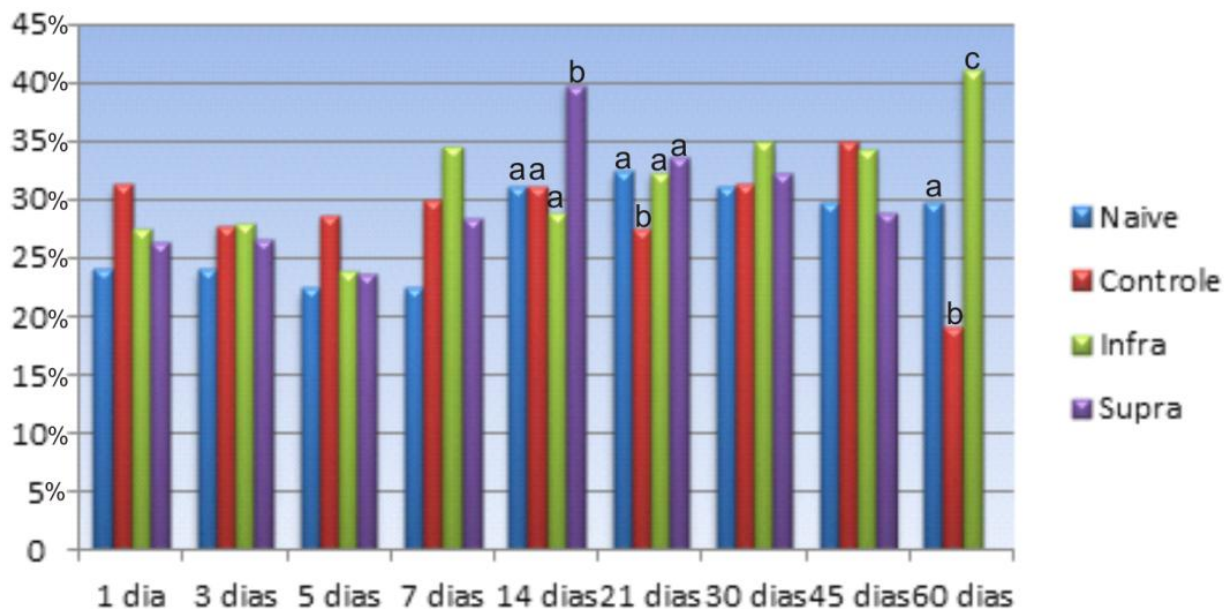


Gráfico 6- Porcentagem da área de substância amorfa no ligamento periodontal no terço cervical da porção distal da raiz mesial capturado com a objetiva de 100x. Diferença significativa para $p < 0,05$.

Área de Reabsorção

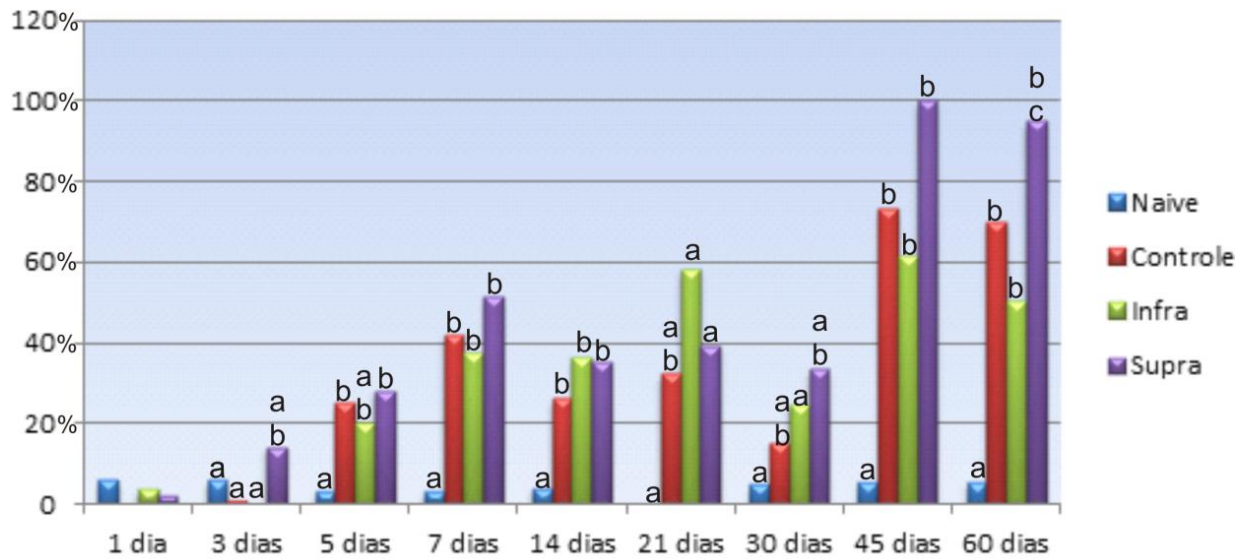


Gráfico 7- Porcentagem da área de reabsorção da porção distal da raiz mesial capturado com a objetiva de 4x. Diferença significativa para $p < 0,05$.

Vasos Sanguíneos

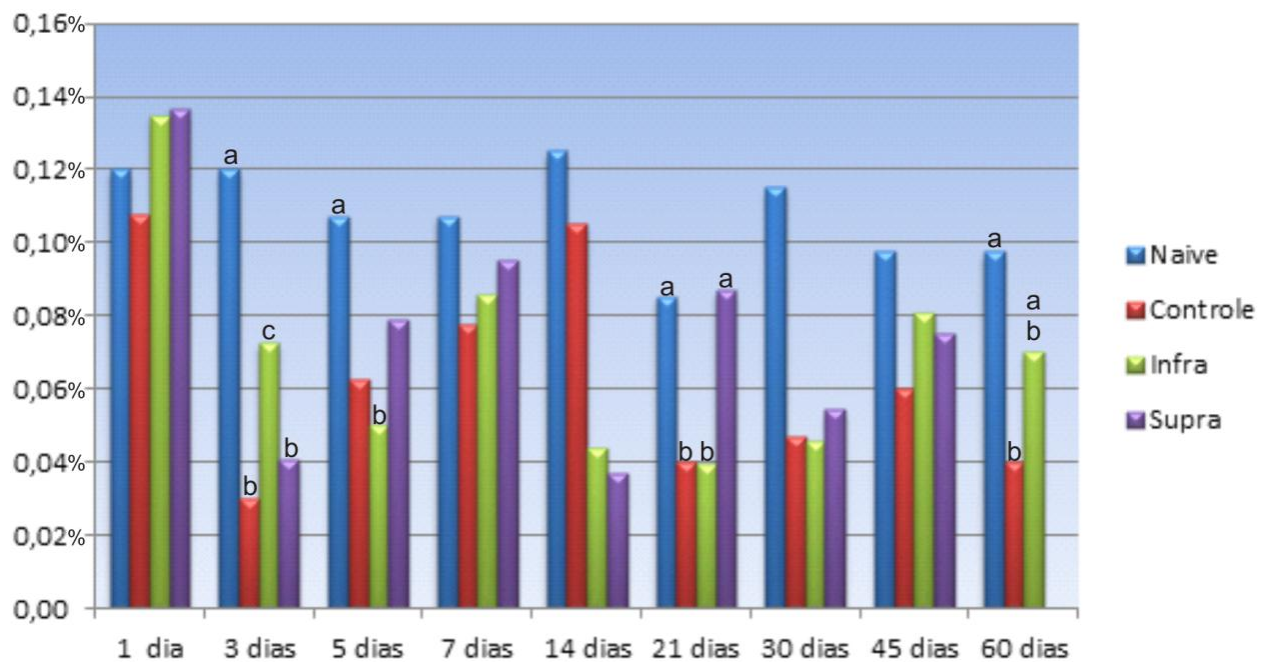


Gráfico 8- Porcentagem da área de vasos sanguíneos no ligamento periodontal no terço cervical da porção distal da raiz mesial capturado com a objetiva de 100x. Diferença significativa para $p < 0,05$.

Área de Anquilose

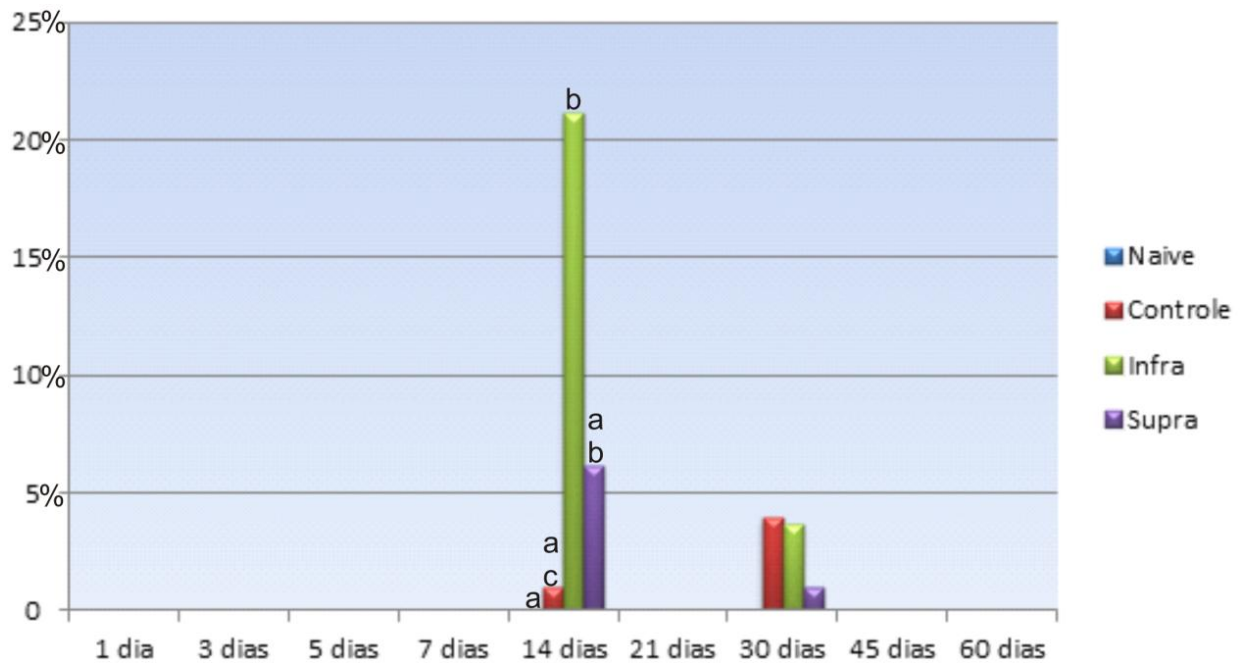


Gráfico 9- Porcentagem da área de anquilose na porção distal da raiz mesial capturado com a objetiva de 4x. Diferença significativa para $p < 0,05$.

Perfil Nuclear

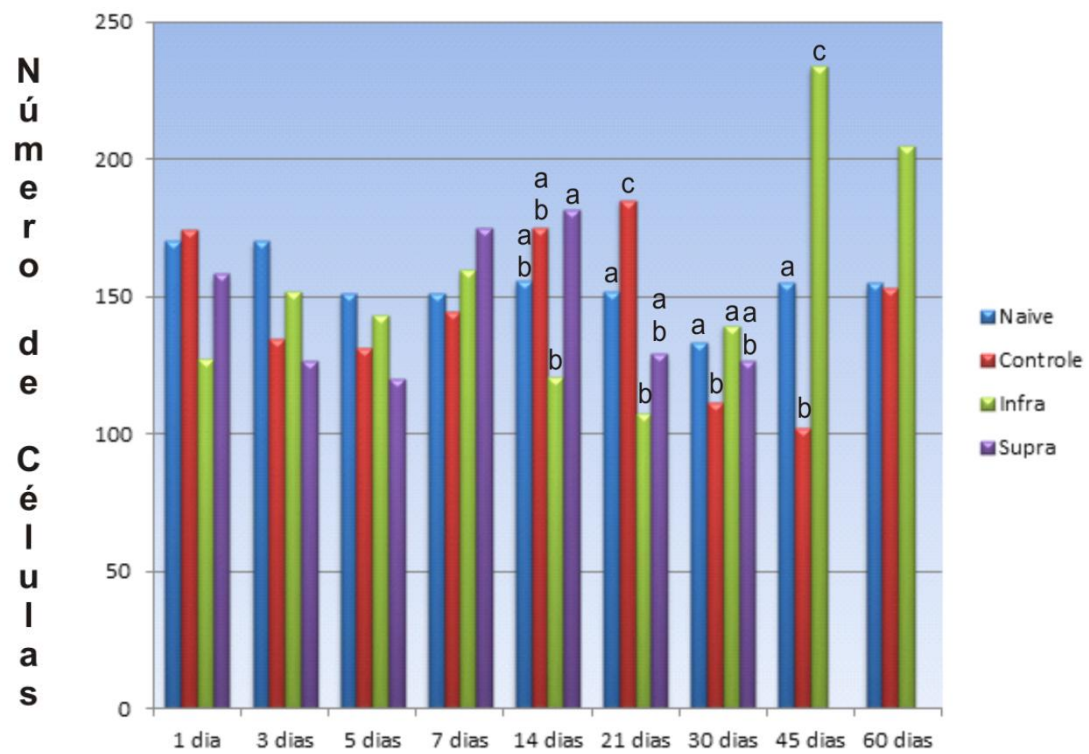


Gráfico 10-Número de perfis nucleares no ligamento periodontal do terço cervical da porção distal da raiz mesial capturado com a objetiva de 4x. Diferença significativa para $p < 0,05$.

Anexo B



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

CERTIFICADO

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

CERTIFICATE

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



Prof. Dr. Edilson Ervolino
CEUA Vice-Coordenador

Anexo C

Normas para publicação

DENTAL TRAUMATOLOGY

1. GENERAL

Dental Traumatology is an international journal which aims to convey scientific and clinical progress in all areas related to adult and pediatric dental traumatology. It aims to promote communication among clinicians, educators, researchers, administrators and others interested in dental traumatology. The journal publishes original scientific articles, review articles in the form of comprehensive reviews or mini reviews of a smaller area, short communication about clinical methods and techniques and case reports. The journal focuses on the following areas related to dental trauma:

Epidemiology and Social Aspects Tissue, Periodontal, and Endodontic Considerations
Pediatrics and Orthodontics Oral and Maxillofacial Surgery/ Transplants/ Implants
Esthetics/ Restorations/ Prosthetics Prevention and Sports Dentistry.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in *Dental*

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

2. ETHICAL GUIDELINES

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

2.1. Authorship and Acknowledgements

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

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

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

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

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

2.2. Ethical Approvals

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

2.3 Clinical Trials

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

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

2.4 DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations

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

2.5 Conflict of Interest

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

2.6 Appeal of Decision

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

2.7 Permissions

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

2.8 Copyright Assignment

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

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

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

Poh Hoon TENG

Production Editor

Wiley Services Singapore Pte Ltd

600 North Bridge Road, #05-01 Parkview Square

Singapore 188778

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

3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

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

3.1. Getting Started•

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

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

3.2. Submitting Your Manuscript

- After you have logged into your 'Author Centre', submit your manuscript by clicking the submission link under 'Author Resources'.

- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.

- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.

- You are required to upload your files.
 - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
 - Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button.
 - When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
- To allow double blinded review, please submit (upload) your main manuscript and title page as separate files. Please upload:
 - Your manuscript without title page under the file designation 'main document' - Figure files under the file designation 'figures'.
 - The title page, Acknowledgements and Conflict of Interest Statement where applicable, should be uploaded under the file designation 'title page'

- Review your submission (in HTML and PDF format) before completing your submission by sending it to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing. All documents uploaded under the file designation 'title page' will not be viewable in the html and pdf format you are asked to review in the end of the submission process. The files viewable in the html and pdf format are the files available to the reviewer in the review process.

3.3. Manuscript Files Accepted

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

3.4. Blinded Review

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

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

- Your manuscript without title page under the file designation 'main document'

- Figure files under the file designation 'figures'
- The title page, Acknowledgements and Conflict of Interest Statement where applicable, should be uploaded under the file designation 'title page' All documents uploaded under the file designation 'title page' will not be viewable in the html and pdf format you are asked to review in the end of the submission process. The files viewable in the html and pdf format are the files available to the reviewer in the review process.

3.5. Suggest a Reviewer

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

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

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

3.7. E-mail Confirmation of Submission

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

3.8. Manuscript Status

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

3.9. Submission of Revised Manuscripts

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

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

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

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

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

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

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

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

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

may reflect improvements in clinical practice such as introduction of new technology or practical approaches. They should conform to a high scientific and a high clinical practice standard.

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

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

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. It is preferred that manuscript is professionally edited. A list of independent suppliers of editing services can be found at:

http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Abbreviations, Symbols and Nomenclature: Abbreviations should be kept to a minimum, particularly those that are not standard. Non-standard abbreviations must be used three or more times and written out completely in the text when first used. Consult

the following sources for additional abbreviations: 1) CBE Style Manual Committee. Scientific style and format: the CBE manual for authors, editors, and publishers. 6th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1994; and 2) O'Connor M, Woodford FP. Writing scientific papers in English: an ELSE-Ciba Foundation guide for authors. Amsterdam: Elsevier-Excerpta Medica; 1975.

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

5.2. Structure

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

Title Page: should be uploaded as a separate document in the submission process under the file designation 'Title Page' to allow blinded review. It should include: Full title of the manuscript, author(s)' full names and institutional affiliations including city, country, and the name and address of the corresponding author. If the author does not want the e-mail address to be published this must be clearly indicated. The title page

should also include a running title of no more than 60 characters and 3-6 keywords.

Abstract is limited to 300 words in length and should contain no abbreviations. The abstract should be included in the manuscript document uploaded for review as well as inserted separately where specified in the submission process. The abstract should convey the essential purpose and message of the paper in an abbreviated form. For original articles the abstract should be structured with the following headings: Background/Aim, Material and Methods, Results and Conclusions. For other article types, please choose headings appropriate for the article.

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

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

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

procedures in sufficient detail. Give references to established methods, including statistical methods, describe new or modify methods. Identify precisely all drugs used including generic names and route of administration.

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

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

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

Results should present the observations with minimal reference to earlier literature or to possible interpretations. Present your results in logical sequence in the text, tables and

illustrations giving the main or most important findings first. Do not duplicate data in graphs and tables.

Discussion may usually start with a brief summary of the major findings, but repetition of parts of the Introduction or of the Results sections should be avoided. The section should end with a brief conclusion and a comment on the potential clinical relevance of the findings. Link the conclusions to the aim of the study. Statements and interpretation of the data should be appropriately supported by original references.

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

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

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

5.3. References

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

1997;126:36-47.

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

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

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

Journals:

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

Examples:

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

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

Books and other monographs:

Examples:

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

5.4. Tables, Figures and Figure Legends

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

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

information on our digital illustration standards can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

Unnecessary figures and parts (panels) of figures should be avoided: data presented in small tables or histograms, for instance, can generally be stated briefly in the text instead. Figures should not contain more than one panel unless the parts are logically connected

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

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

size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Further information can be obtained at Blackwell Publishing's guidelines for figures: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

Check your electronic artwork before submitting it: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>

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

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

5.5. Supporting Material

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

Supporting Material, such as data sets or additional figures or tables, that will not be published in the print edition of the journal, but which will be viewable via the online edition, can be submitted. It should be clearly stated at the time of submission that the

Supporting Material is intended to be made available through the online edition. If the size or format of the Supporting Material is such that it cannot be accommodated on the journal's Web site, the author agrees to make the Supporting Material available free of charge on a permanent Web site, to which links will be set up from the journal's website. The author must advise Blackwell Publishing if the URL of the website where the Supporting Material is located changes. The content of the Supporting Material must not be altered after the paper has been accepted for publication.

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

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

6. AFTER ACCEPTANCE

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

6.1 Proof Corrections

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site.

Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following web site: www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html. This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof.

6.2 Early View (Publication Prior to Print)

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

6.3 Author Services

Online production tracking is available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at

key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.\

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

6.4 Author Material Archive Policy

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

6.5 Offprints and Extra Copies

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

6.6 Note to NIH Grantees

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