



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

**ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM ORTODONTIA**

CRISTIANO MIRANDA DE ARAUJO

**EFEITO DO ETANOL E NICOTINA NA MOVIMENTAÇÃO
ORTODÔNTICA EM RATOS WISTAR**

**Curitiba
2017**



CRISTIANO MIRANDA DE ARAUJO

EFEITO DO ETANOL E NICOTINA NA MOVIMENTAÇÃO ORTODÔNTICA EM RATOS WISTAR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia, Área de Concentração em Ortodontia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Elisa Souza Camargo

**Curitiba
2017**

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

A663e Araujo, Cristiano Miranda de
2017 Efeito do etanol e nicotina na movimentação ortodôntica em ratos wistar /
Cristiano Miranda de Araujo ; orientadora: Elisa Souza Camargo. – 2017.
47 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba,
2017
Bibliografia: f. 36-37

1. Ortodontia. 2. Movimentação dentária. 3. Nicotina. 4. Etanol. I. Camargo,
Elisa Souza. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de
de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDD 20. ed. – 617.643



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola Saúde e Biociências
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

PUCPR
GRUPO MARISTA

TERMO DE APROVAÇÃO

CRISTIANO MIRANDA DE ARAUJO

EFEITO DO ETANOL E NICOTINA NA MOVIMENTAÇÃO ORTODÔNTICA EM RATOS WISTAR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de **Doutor em Odontologia**, Área de Concentração em **Ortodontia**.

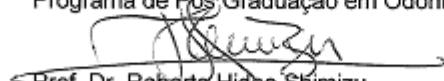
Orientador (a):


Prof. Dr.ª Elisa Souza Camargo
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof. Dr.ª Aline Cristina Batista Rodrigues Johann
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof. Dr. Odilon Guariza Filho
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof. Dr.ª Margareth Maria Gomes de Souza
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFRJ


Prof. Dr. Roberto Hideo Shimizu
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, ILAPEO

Curitiba, 28 de Abril de 2017.

Dedico esta tese primeiramente à Deus, pois sem Ele nada poderia existir. À minha esposa Bianca Marques de Mattos de Araujo, por todo amor, carinho e cumplicidade, você é meu porto seguro.

Agradecimento especial

A minha orientadora, Prof^a Dra. Elisa Souza Camargo. A palavra “orientador” no dicionário têm o significado de: *Aquele que orienta, conduz, direciona, guia*. Isto é uma clara definição de tudo o que foi durante estes quatro anos, para mim. Você é um exemplo de orientadora. Obrigado por toda ajuda, disposição e tempo despendido em minha orientação. Com certeza você é alguém que admiro. Toda educação, caráter, profissionalismo e amizade, com que trata seus orientados. Minha imensa gratidão!

Agradecimentos

Primeiramente a Deus. Quando ainda era criança tive a infelicidade de ver minha mãe partir tão cedo. Vi meu pai ficar sozinho com cinco filhos para criar. Um cenário assim poderia gerar uma falta de perspectiva. Mas Tu óh Deus me deu perspectiva, o Senhor me conduziu até aqui. Por isto toda honra, glória e louvor sejam a Ti, e somente a Ti.

À minha esposa Bianca Marques de Mattos de Araujo, palavras são pequenas para expressar minha gratidão à você. Todo companheirismo, cumplicidade, amor e incentivo que você proporcionou e proporciona a mim à cada dia. À você prometo meu amor eterno, como forma de gratidão por tudo que é e representa para mim.

Ao meu pai, Darci Pereira de Araujo, você é meu herói. Todo seu caráter, honestidade, esforço, humildade, me fazem te admirar. Com certeza se hoje chego até aqui, foi por tudo que já fez, e ainda faz por mim. O senhor será sempre meu espelho de figura humana.

À minha mãe (*In Memoriam*), Adail Miranda de Araujo, convivi pouco tempo ao seu lado, porém, levarei teu exemplo de pessoa dedicada, estudiosa e amorosa por toda a vida. Sua dedicação e amor pelos estudos me influenciaram a hoje estar seguindo mais este passo em minha vida acadêmica.

Aos meus irmãos, Alessandro Miranda de Araujo, Sandro Miranda de Araujo, Leandro Miranda de Araujo, Juliano Miranda de Araujo e Lucas Rosa de Araujo, por sempre estarem ao meu lado, torcendo por mim.

Aos meus sogros, Marcius Lucio Montes de Mattos e Luciane Marques de Mattos, e cunhadas, Paola Marques de Mattos e Giovanna Marques de Mattos, obrigado por todo incentivo e ajuda que sempre me proporcionam. Sou grato por ter a honra de ser parte da família.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná, por ter me proporcionado toda minha formação, desde a graduação. Esta será sempre minha segunda casa.

À Prof^a Dra. Renata Iani Weneck, coordenadora do Programa de Pós-graduação em Odontologia, por exercer com maestria esta árdua função.

Ao Prof. Dr. Odilon Guariza Filho, obrigado por tudo que já me ensinou e ainda me ensina. Existem pessoas que marcam positivamente nossas vidas, e com certeza você é uma delas. Obrigado pela amizade e companheirismo. Serei sempre grato.

Ao Prof. Dr. Orlando Motohiro Tanaka, hoje ao término do doutorado, olho para trás e vejo o quanto sua orientação no mestrado me ajudou e acrescentou em minha vida acadêmica. Muito obrigado por tudo.

À Prof^a Dra. Aline Cristina Batista Rodrigues Johann, por ser um exemplo de professora. Sei do quanto seus alunos a admiram, e isto foi conquistado com muito merecimento. Obrigado por toda ajuda desde a execução do trabalho, quanto na correção desta tese.

À Prof^a Dra. Margareth Maria Gomes de Souza, que aceitou gentilmente o convite para participar da minha banca de defesa. Agradeço por ter dedicado o seu precioso tempo para contribuir com esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto Hideo Shimizu, da mesma forma agradeço pela forma que aceitou gentilmente o convite para participar da minha banca de defesa. Suas considerações irão acrescentar muito a este trabalho.

Ao Prof. Doutor Sérgio Ignácio, pela análise estatística dos dados da presente tese. Por toda sua dedicação e competência, exercendo com maestria sua função. Muito obrigado.

À Prof^a Luciana Reis Azevedo Alanis, pelas ótimas sugestões dadas na banca de qualificação desta tese. Muito obrigado, com certeza sua participação engrandeceu o trabalho.

À Ms. Adriana Cristina Rocha Haerber, a qual não mediu esforços para realização deste trabalho. Sua ajuda foi de extrema importância, com certeza se hoje este trabalho existe, é por seu mérito também.

À secretária Neide Reis Borges pela excelência em realizar o seu trabalho junto ao Programa de Pós-graduação da PUCPR.

À todos colegas que estiveram presentes comigo no Doutorado. A caminhada se tornou mais agradável ao lado de vocês.

Aos auxiliares do Laboratório da Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da PUCPR, Misael Gomes Barbosa e Álvaro Roberto Gonçalves Machado, pela dedicação, colaboração e atenção destinada à fase experimental dessa pesquisa.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Experimental Ana Paula Martins, Marina Azevedo e Seigo Nagashima por todo esforço e dedicação para obter o sucesso na realização desse trabalho.

Aos animais que doaram a sua vida para servir a esse experimento e ao desenvolvimento da ciência.

“A soma total da nossa sabedoria, a que merece o nome de sabedoria verdadeira e certa, abrange estas duas partes: o conhecimento que se pode ter de Deus, e o de nós mesmos. Quanto ao primeiro, deve-se mostrar não somente que há um só Deus, a quem é necessário que todos prestem honra e adorem, mas também que Ele é a fonte de toda verdade, sabedoria, bondade, justiça, juízo, misericórdia, poder e santidade, para que dele aprendamos a ouvir e a esperar todas as coisas. Deve-se, pois, reconhecer, com louvor e ação de graças, que tudo dele procede.”

*João Calvino
Soli Deo Gloria*

SUMÁRIO

ARTIGO 1 - VERSÃO EM PORTUGUÊS	1
Página título	1
Resumo.....	2
Introdução	3
Material e Métodos.....	5
Resultados	11
Discussão.....	14
Conclusão	17
Referências	18
ARTIGO 1 - VERSÃO EM INGLÊS	19
Title Page	20
Abstract	21
Introduction	22
Material and Methods.....	23
Results	29
Discussion	32
Conclusion.....	35
References	36
Anexos.....	38

1 **ARTIGO 1 - VERSÃO EM PORTUGUÊS**

2 **EFEITO DO ETANOL E NICOTINA NA MOVIMENTAÇÃO**
3 **ORTODÔNTICA EM RATOS WISTAR**

4 **Cristiano Miranda de Araujo**, DDS, MS

5 Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil

6 Escola de Ciências da Vida

7 Programa de Pós-graduação em Odontologia - Ortodontia

8 Email : cristiano.m.araujo@hotmail.com

9

10 **Elisa Souza Camargo**, DDS, MS, PhD

11 Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil

12 Escola de Ciências da Vida

13 Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Ortodontia

14 Email : escamargo@uol.com.br

15

16 **Autor correspondente:**

17 **Elisa Souza Camargo**

18 Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil

19 Escola de Ciências da Vida

20 Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Ortodontia

21 Endereço: Rua Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho

22 80215-901 Curitiba, Paraná, Brasil

23 Fone: 55 41 3271-1637/Fax 55 41 3271-1405

24 Email: escamargo@uol.com.br

RESUMO

Introdução: O objetivo desta pesquisa foi avaliar a ação da nicotina (1mg/Kg) e etanol (3g/kg) sobre a neoformação e reabsorção óssea, taxa de movimento dentário e peso corporal, durante o movimento dentário em ratos. **Métodos:** 200 ratos foram divididos em oito grupos: S – Salina sem movimento dentário (n=15), N – Nicotina sem movimento dentário (n=25), E – Etanol 20% sem movimento dentário (n=25), NE – Nicotina + Etanol 20% sem movimento dentário (n=25), SM – Salina com movimento dentário (n=30), NM – Nicotina com movimento dentário (n=30), EM – Etanol 20% com movimento dentário (n=30), NEM – Nicotina + Etanol 20% com movimento dentário (n=30), todas as soluções foram aplicadas uma vez ao dia. O etanol mimetizou o padrão binge (4 dias de aplicação com 3 de abstinência). Todas as soluções foram aplicadas durante 32, 44 e 58 dias, conforme cada subgrupo. A movimentação ortodôntica (25cN) iniciou após 30 dias de aplicação para os grupos com movimento dentário. Os ratos foram eutanasiados 2, 14 e 28 dias após o início do movimento dentário. As secções foram coradas pelas técnicas picrosirius e fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP). A taxa de movimentação dentária foi mensurada em modelos de gesso, e o peso avaliado semanalmente. Os dados foram comparados por ANOVA a dois critérios, Tukey HSD e Games-Howell. **Resultados:** No 28º dia de movimentação dentária, o grupo NEM apresentou menor porcentagem de colágeno Tipo I em relação ao grupo SM ($p=0,0448$), e o grupo S no 28º dia apresentou maior número de osteoclastos/ μm^2 no ligamento periodontal, comparado ao grupo N ($p=0,0405$). **Conclusão:** A nicotina e o etanol não interferiram na taxa de movimentação dentária e peso corporal. A nicotina diminuiu o número de osteoclastos quando não foi induzido o movimento dentário. Quando a nicotina foi associada ao etanol, interferiu na maturação das fibras colágenas, durante o movimento ortodôntico.

Palavras-Chave: Nicotina, Etanol, Movimento dentário, Ortodontia.

1 INTRODUÇÃO

2 O abuso de nicotina e álcool é relativamente comum, e ocupam a primeira
3 e a terceira posição no ranking de causa evitáveis de mortes nos Estados
4 Unidos,¹⁻³ com mais de 480.000 e 80.000 mortes, respectivamente, por ano.² A
5 nicotina é uma entre aproximadamente duas mil substâncias com potencial tóxico
6 na fumaça do cigarro,⁴ e tem sido identificada como a mais importante para
7 promover os efeitos patogênicos induzidos pelo tabaco sobre o periodonto,⁵ além
8 de ser um fator de risco para osteoporose e dificultar o reparo de fraturas
9 ósseas.^{6,7} O etanol é o principal componente das bebidas alcoólicas, é
10 considerado tóxico para os ossos,⁸ e promove vários efeitos diretos sobre a
11 atividade das células ósseas, como a inibição da diferenciação das células
12 mesenquimais presentes na medula óssea em osteoblastos, e também o
13 crescimento das células osteoblásticas.⁹

14 Embora os riscos do tabagismo sejam conhecidos há décadas, são
15 estimados 1,3 bilhão de fumantes em todo o mundo.¹⁰ Estudos indicam que a
16 nicotina desempenha papel importante no metabolismo ósseo. Sodagar et al.,¹¹
17 avaliaram a taxa de movimento dentário em ratos submetidos a 28 dias de
18 aplicação de nicotina, e observaram que após 14 dias de movimentação a
19 nicotina acelerou o movimento dentário destes animais, e este efeito foi dose-
20 dependente. Da mesma forma Bakathir et al.,¹² também aplicaram nicotina
21 durante 28 dias, sendo que deste total, em 14 dias foi realizada movimentação
22 ortodôntica, e observaram que a nicotina acelerou a movimentação ortodôntica
23 gerando um desequilíbrio entre reabsorção e neoformação óssea. Por outro lado,
24 Shintcovsk et al.,¹³ em um estudo histológico avaliou o efeito da nicotina (2
25 mg/kg) sobre o movimento dentário em ratos, e observaram que a nicotina afetou
26 a remodelação óssea, reduzindo a angiogênese, células osteoclásticas, lacunas
27 de Howship e promovendo um atraso na maturação do colágeno na matriz óssea.

28 O álcool é amplamente consumido em todo o mundo, envolvendo distintos
29 contextos sócio-culturais. O abuso no consumo de álcool se constitui como um
30 problema de saúde pública nos Estados Unidos, com práticas de consumo
31 perigosas nas populações de adolescentes e adultos jovens, sendo o padrão de
32 consumo Binge o mais comum nesta faixa etária.^{14,15} Segundo Rolland et al.,¹⁶ a
33 definição do que é o “padrão de consumo Binge” varia na literatura científica,

1 dependendo do autor ou da instituição, entretanto o instituto nacional de
2 alcoolismo e abuso do álcool (NIAAA), ramo do departamento de saúde dos
3 Estados Unidos, define como um padrão de consumo de álcool que traz altos
4 níveis séricos de concentração etílica, o que ocorre geralmente após 4 bebidas
5 para mulheres e 5 bebidas para os homens, em cerca de 2 horas. Sendo assim,
6 não é apenas uma alta concentração sérica, mas é também a associação com
7 um curto espaço de tempo.¹⁶ Barcia et al.,¹⁷ através de uma revisão bibliográfica
8 sobre o efeito do etanol na ortodontia, ressaltam que apesar do fato de vários
9 estudos indicarem o potencial efeito deletério do etanol no periodonto e no osso
10 alveolar, há apenas um trabalho na literatura científica sobre os efeitos do etanol
11 durante o movimento dentário. Este único estudo foi realizado por Araujo et al.,⁸
12 utilizando dose de 3g/kg/dia de etanol 20% em ratos, onde mimetizaram o padrão
13 binge de consumo de etanol, avaliaram o efeito sobre a movimentação
14 ortodôntica, e observaram que houve decréscimo na reabsorção óssea no 28º dia
15 de movimentação ortodôntica.

16 Nicotina e álcool, consumidos separadamente, são prejudiciais à
17 integridade do tecido ósseo, entretanto quando em conjunto, podem intensificar
18 estes efeitos.¹⁸ Soares et al.,¹⁹ observaram em ratos que receberam solução
19 diluída de etanol a 10% e nicotina 1.25mg/kg pelo período de 4 semanas, houve
20 a redução da osteogênese ao redor de implantes, bem como na resistência
21 mecânica do osso. Não há na literatura nenhum trabalho científico que tenha
22 avaliado o efeito destas substâncias em conjunto sobre o movimento dentário.

23 Na prática ortodôntica a prevalência de fumantes em tratamento
24 ortodôntico representa em média 26% dos adultos e 12% dos adolescentes.⁵
25 Conforme os dados da Associação Americana de Ortodontistas, do ano de 1994
26 a 2010 a percentagem de adultos que utilizaram aparelho ortodôntico subiu de
27 680.000 para 1.1 milhão por ano (58%), muitos dos quais segundo Barcia et al.,¹⁷
28 podem utilizar etanol, em algum momento, ao longo do tratamento ortodôntico.
29 Uma vez que o consumo excessivo de bebidas alcoólicas está altamente
30 correlacionado ao tabagismo,²⁰ é de extrema importância o conhecimento do
31 efeito destas duas substâncias sobre o movimento ortodôntico.

32 Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da nicotina e
33 etanol durante o movimento dentário em ratos nos seguintes aspectos:

1 neoformação óssea, reabsorção óssea, taxa de movimento dentário e peso
2 corporal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

4 O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de Animais
5 da PUCPR (#778/#779).

7 Amostra

8 A amostra inicial foi constituída por 210 ratos machos da linhagem *Wistar*
9 (*Rattus norvegicus albinus*) com aproximadamente 9 semanas de vida, pesando
10 entre 300–350g. Os animais foram fornecidos e mantidos pelo Biotério da
11 PUCPR, no qual todos os cuidados em relação à higiene, iluminação, ventilação
12 e alimentação dos ratos foram respeitados seguindo as recomendações e
13 orientações éticas do Canadian Council on Animal Care.²¹

14 Os animais foram alimentados à base de água e ração *ad libitum* durante
15 todo o experimento. Antes da instalação dos dispositivos para movimentação
16 dentária a ração foi fornecida na consistência sólida. Após a instalação dos
17 dispositivos a ração passou a ser fornecida triturada, no intuito de prevenir
18 eventuais danos à aparelhagem ortodôntica e facilitar a alimentação dos animais.
19 A temperatura foi controlada entre 19° e 22° e fotoperíodo de 12 horas claro e 12
20 horas escuro. A alimentação, temperatura, condições de alojamento foram
21 idênticos a todos os ratos e todos permaneceram no mesmo biotério.

22 Os animais foram randomizados em oito grupos (Fig 1). O grupo S ficou
23 com menor tamanho de amostra devido a questões envolvendo a liberação de
24 animais pelo comitê de ética.

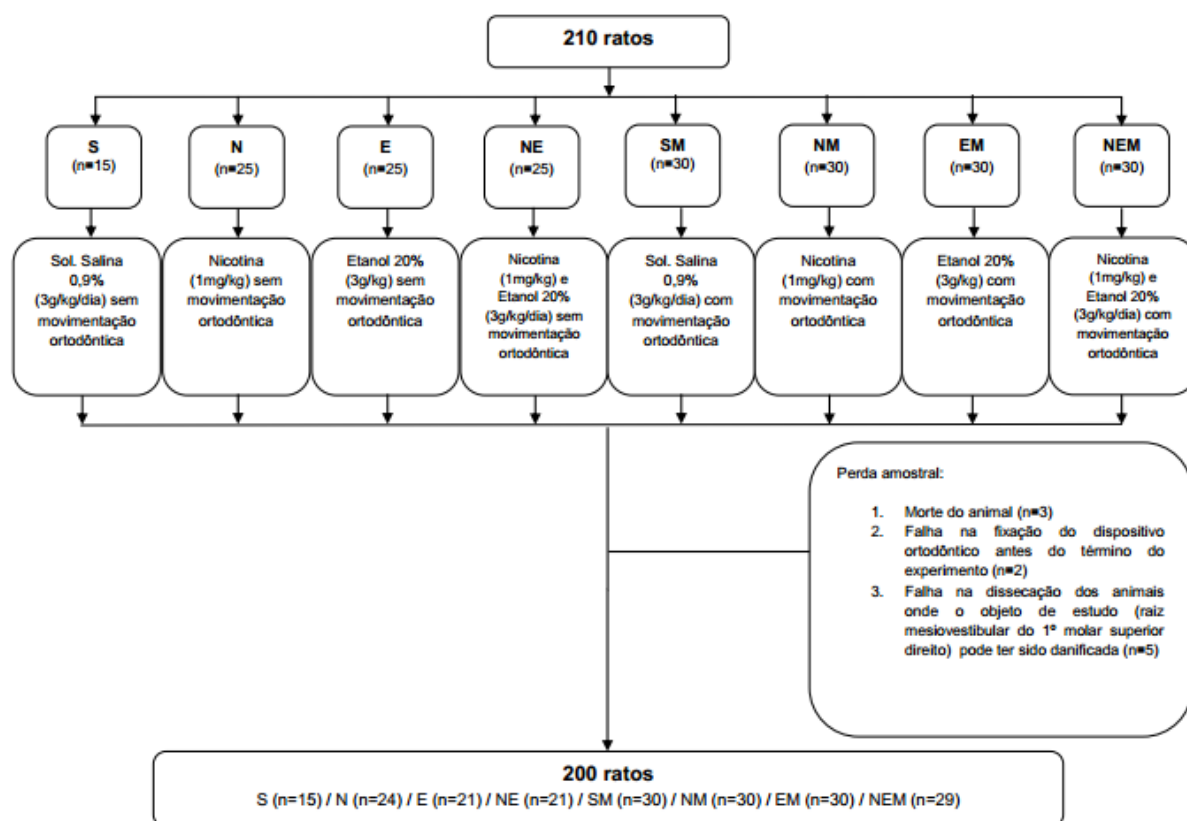


Fig 1. Desenho esquemático da distribuição de animais por grupo (amostra inicial e amostra final).

A administração do etanol 20% ocorreu por via intraperitoneal, na dosagem de 3g/kg^{8,22}, mimetizando o padrão Binge de consumo de etanol, administrado por quatro dias subseqüentes, seguidos por três dias de abstinência.^{8,23} A nicotina (Nicotine hemisulphate, Sigma-Aldrich Chemicals Pvt Ltd, St. Louis, MO) foi previamente preparada, diluída em solução salina 0,9%, homogeneizada e administrada por via subcutânea, na dosagem de 1mg/kg^{11,19,24,25} no dorso dos animais, todos os dias sem intervalo, até o dia da eutanásia. A solução salina foi administrada em volume e periodicidade semelhante aos grupos que receberam soluções experimentais. O papel da aplicação da solução salina foi evitar o viés da interferência do estresse gerado ao animal durante a aplicação. Todas as soluções foram aplicadas uma vez ao dia, durante 32, 44 e 58 dias, conforme cada subgrupo. A movimentação ortodôntica iniciou após 30 dias de aplicação para os grupos com movimento dentário.

1 Como a solução aplicada não foi semelhante a todos os grupos, não foi
2 possível o cegamento do pesquisador que realizou a administração das soluções
3 nos animais. Entretanto, foi realizado o cegamento do pesquisador para realizar
4 as mensurações, impossibilitando qualquer viés quanto à análise dos desfechos
5 da pesquisa.

6 Os ratos foram pesados semanalmente, através de balança eletrônica de
7 precisão (Gehaka – BG 4001, São Paulo, Brasil) com o intuito de ajustar a dose
8 da substância administrada. A variação do peso corporal foi calculada pela
9 fórmula:

$$\text{Variação do peso corporal} = \text{peso inicial} - \text{peso final}$$

10
11 Após 32, 44 e 58 dias do início do experimento os animais dos grupos
12 controle foram eutanasiados, conforme o subgrupo a que pertenciam, ou seja,
13 após 2, 14 e 28 dias de movimento dentário para os grupos com aparatologia
14 ortodôntica. Todos os animais foram eutanasiados por overdose de solução
15 anestésica (Ketamina 270mg/Kg / Xilazina- 30g/Kg), via intraperitoneal.

16 17 **Movimento dentário induzido**

18 A indução do movimento dentário foi realizada através de dispositivo
19 ortodôntico^{8,26,27} constituído por uma mola de níquel-titânio (*Dentsply*
20 *GAC International*, Islandia, NY) e fio de amarrilho de aço inox (*Dental Morelli*
21 *Ltda*, São Paulo, SP, Brasil) com 0,025 milímetros, para fixação da mola ao
22 primeiro molar superior direito e incisivos centrais, e transmitir força recíproca de
23 25cN.²⁶ A força foi mensurada por meio de dinamômetro (*Haag-Streit AG*, Koeniz,
24 Suíça), previamente calibrado. A extremidade do fio de amarrilho foi fixada no
25 incisivo superior direito, e com resina composta (*Charisma*, *Heraeus*, *Hanau*,
26 Germany), o amarrilho foi fixado ao dente. Para aumentar a estabilidade do
27 dispositivo, o incisivo superior esquerdo também foi recoberto com resina. Após a
28 ativação inicial, a mola não foi reativada durante o período experimental. No
29 entanto, seu posicionamento foi conferido diariamente.

30 31 **Processamento Histotécnico**

32 Após a eutanásia dos animais, as hemimaxilas direitas foram removidas,
33 armazenadas em formaldeído a 10% por 24 horas e desmineralizadas com ácido
34 etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 5% por 2 meses. Após a desmineralização,

os espécimes foram processados e embebidos em parafina no laboratório de patologia experimental da PUCPR.

Para cada peça foram obtidas seis secções transversais, para cada coloração, a partir do terço cervical da raiz méso-vestibular do primeiro molar superior, cortadas em micrótomo com 4µm de espessura, com a superfície oclusal do molar paralela ao micrótomo e com intervalo de 60 µm entre cada secção. Totalizando 1200 secções para cada coloração. As secções foram coradas pelas técnicas picosirius e fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP).

A neoformação óssea foi verificada através da coloração picosirius. Uma área do osso adjacente ao lado onde as fibras estavam mais estiradas foi escolhido para avaliação, pois durante o movimento ortodôntico o osso é depositado na parede alveolar do lado de tração. As imagens foram capturadas utilizando um microscópio Olympus BX-50 (Olympus, Tóquio, Japão) com lente polarizada Olympus® U-Pot (Olympus, Tóquio, Japão) e acoplado à microcâmera Dinolite® (AmMo Eletronics Corporation, New Taipei City, Taiwan) com magnificação de 200x. As imagens foram avaliadas através do analisador de imagens Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, MD), o qual mensurou a percentagem da área de colágeno maduro e imaturo no osso alveolar.²⁸ Foi considerado colágeno do tipo I (colágeno maduro) aquele que apresentasse coloração vermelho-alaranjada, enquanto o colágeno do tipo III (imaturo), coloração verde-amarelada.²⁸ A percentagem de colágeno para cada animal foi obtido pela média das seis secções.

Nos cortes corados por TRAP, foi avaliada a reabsorção óssea pelo número de osteoclastos por micrômetro quadrado (µm²) no ligamento periodontal. Esta enzima é considerada marcador pontual de células osteoclásticas, permitindo quantificar a reabsorção óssea. Desta forma, células TRAP-positivas, multinucleadas, no ligamento periodontal adjacente ao osso alveolar foram consideradas como osteoclastos funcionais e quantificadas.¹³ Para tanto foram capturadas imagens de todo ligamento periodontal, onde estivessem presentes células TRAP-positivas, utilizando um microscópio Olympus BX-50 acoplado à microcâmera Dinolite® em magnificação de 400x. Para a obtenção da média de osteoclastos por µm², foi capturada uma imagem de todo o ligamento com o mesmo microscópio e microcâmera, em magnificação de 50x, e a área de todo ligamento periodontal foi quantificada com auxílio da ferramenta “count and

measure objects” do programa de morfometria Image Pro-Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Para quantificação dos osteoclastos, as imagens foram analisadas no programa de morfometria Image Pro-Plus 4.5 no qual foi aplicada grade para contagem dos osteoclastos. Após a obtenção destes dados (número de células TRAP-positivas em todo ligamento e área do ligamento periodontal) foi feita a média para obtenção do número de osteoclastos/ μm^2 no ligamento periodontal, utilizando a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ total de células TRAP-positivas}}{\text{Área do ligamento}}$$

É unânime na literatura científica que diferentes vetores de força criam diferentes tensões ao longo da raiz. Nenhum dente tem a forma e a proporção ideal, e os pressupostos de linearidade sobre a distribuição da força nos tecidos duros e moles são problemáticos.²⁹ Por este motivo a utilização da média de osteoclastos por micrômetro quadrado (TRAP) e a escolha do osso a ser avaliado baseado no local onde as fibras se encontram mais estiradas (picrosirius) evita o viés de mensuração, pois a distribuição de forças (tensão e compressão) irá variar de acordo com a altura avaliada no longo eixo da raiz.

As mensurações para cada variável foram feitas por apenas um avaliador treinado e calibrado. Com o intuito de demonstrar o poder de reprodutibilidade das mensurações e a calibragem intra-examinador, 30% da amostra foi remensurada, após 21 dias da primeira mensuração. Para o erro de Dahlberg o resultado foi de 1,36%, indicando que o avaliador reproduziu a medida de forma confiável. Em seguida, visando avaliar o erro sistemático, comparou-se a média das variáveis nos dois momentos, utilizando o teste t de *Student* para amostras emparelhadas. O resultado do teste indicou não existir diferença estatisticamente significativa entre os valores médios da variável nos dois momentos.

Taxa de movimento dentário

Para a avaliação da taxa do movimento dentário, foi realizada moldagem do arco dentário superior dos ratos no início (antes da instalação dos dispositivos ortodônticos) e no final do experimento (logo após a eutanásia). Para tal, os animais foram anestesiados (pentobarbital sódico – Syntec, Cotia, Brasil) e moldados com silicone de condensação à base de polidimetilsiloxano (Vigodent

Coltene, Rio de Janeiro, Brasil). Os modelos foram confeccionados com gesso tipo IV (Durone IV Gesso Pedra, Dentsply, Petrópolis, Brasil) (Fig 2).

A distância entre o ponto mais palato-cervical do incisivo superior direito até o ponto mais méso-cervical do primeiro molar superior direito, foi mensurado com auxílio de paquímetro digital (Absolute-Mitutoyo, Kawasaki-Shi, Japan). O movimento dentário foi calculado pela fórmula:

$$\text{Taxa de movimento dentário} = \text{Distância Inicial} - \text{Distância Final}.$$

Para a mensuração de todos os desfechos da pesquisa o pesquisador foi cegado, classificando os animais por números e não pelo grupo a qual pertencia, de maneira que não soubesse a qual grupo o animal pertencia, impossibilitando qualquer viés quanto à seleção de resultados ou influência nos desfechos avaliados.

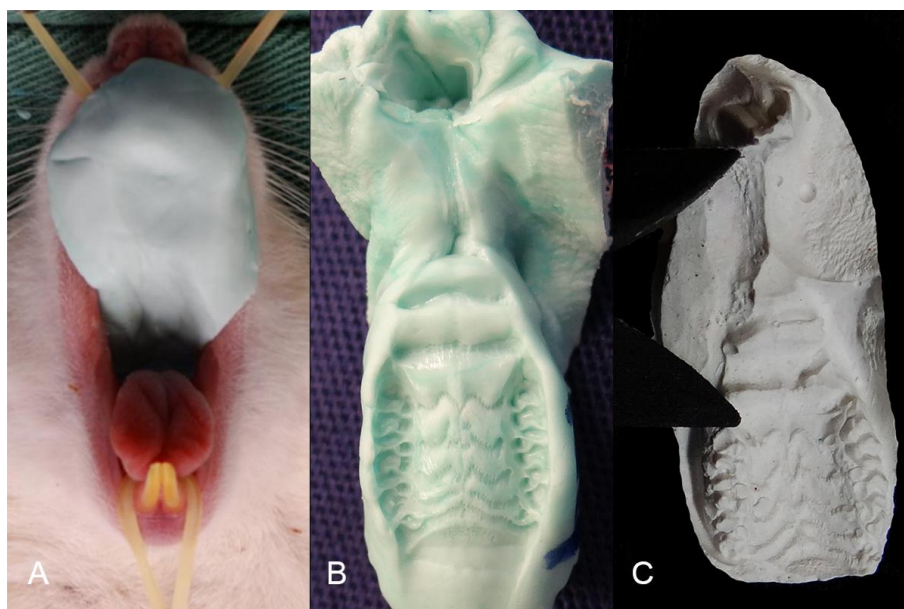


Fig 2. Fotografia do procedimento de moldagem do animal com silicone de condensação (A), confecção dos moldes (B) e aferição da distância da face palatina do incisivo superior direito até a face mesial do primeiro molar superior direito, com auxílio de paquímetro digital (C).

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa SPSS (versão 23.0; IBM SPSS, Armonk, NY). O nível de significância adotado em todos os testes estatísticos foi de 0,05.

Testou-se a normalidade dos dados utilizando o teste de Shapiro Wilk. Na sequência foi testada a homogeneidade das variâncias entre diferentes tratamentos usando o teste de homogeneidade de variância de Levene.

Uma vez que os grupos apresentaram distribuição normal ($p>0,05$), a comparação dos valores médios segundo grupo e tempo foram realizadas utilizando o teste paramétrico ANOVA a dois critérios, modelo fatorial completo. Quando ANOVA indicou existir diferença, e quando os tratamentos apresentaram heterogeneidade de variância ($p<0,05$), a comparação dos tratamentos 2 a 2 foi feita por meio do teste paramétrico de comparações múltiplas para variâncias heterogêneas de Games-Howell; caso contrário utilizou-se o teste de comparações múltiplas de Tukey para variâncias homogêneas. Para cada uma das variáveis dependentes segundo grupo x tempo, calculou-se o poder observado para cada fator e para a interação grupo x tempo (*Poder do teste*).

RESULTADOS

Neoformação óssea

No 28º dia de movimentação dentária, o grupo NEM apresentou menor porcentagem de colágeno Tipo I em relação ao grupo SM ($p=0,0448$) (Tabela I, Fig 3).

Tabela I. Comparações da variável porcentagem de colágeno tipo I (%) na relação grupo x tempo

Grupo/Dia	S (Média ± DP)	N (Média ± DP)	E (Média ± DP)	NE (Média ± DP)	Poder do teste
2 dias	97,45 ± 2,44 ^A	97,79 ± 0,90 ^A	92,89 ± 3,20 ^A	95,29 ± 2,86 ^A	
14 dias	93,45 ± 3,59 ^A	90,01 ± 4,70 ^A	94,44 ± 1,85 ^A	95,85 ± 1,14 ^A	
28 dias	96,35 ± 2,63 ^A	93,33 ± 6,94 ^A	98,41 ± 1,20 ^A	97,77 ± 1,24 ^A	
Grupo/Dia	SM (Média ± DP)	NM (Média ± DP)	EM (Média ± DP)	NEM (Média ± DP)	1,0000
2 dias	86,94 ± 8,04 ^A	93,95 ± 5,62 ^A	73,49 ± 13,66 ^A	91,59 ± 7,17 ^A	
14 dias	87,61 ± 11,47 ^A	89,18 ± 5,83 ^A	84,49 ± 9,41 ^A	93,02 ± 8,28 ^A	
28 dias	91,60 ± 7,08 ^A	85,88 ± 7,19 ^{AB}	80,25 ± 11,03 ^{AB}	77,20 ± 7,35 ^B	

ANOVA a dois critérios modelo fatorial completo: $p<0,05$

Teste de Games Howell

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas

DP = Desvio padrão

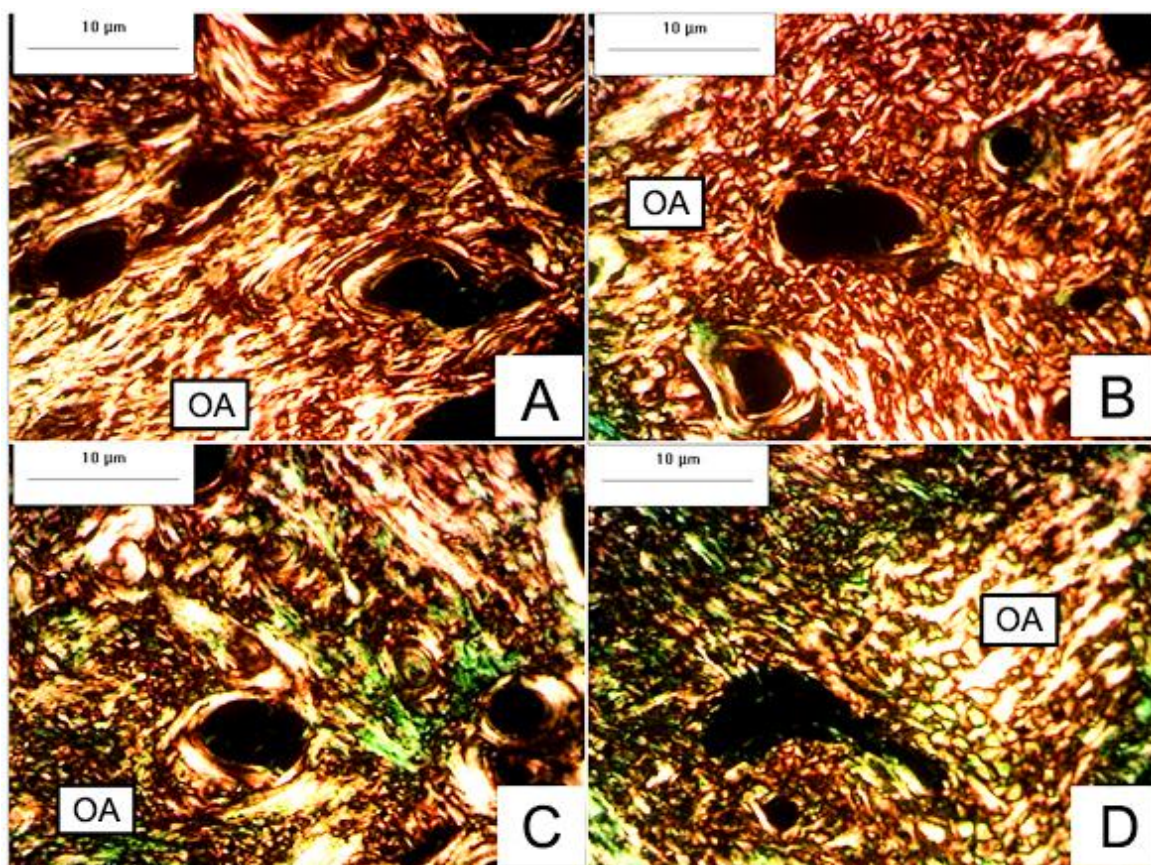


Fig 3. Fotomicrografia de lâminas da área do osso alveolar da raiz mesial vestibular do primeiro molar superior direito, dos grupos SM (A), NM (B) EM (C) e NEM (D) no 28º dia após instalação do dispositivo ortodôntico, havendo diferenças na neoformação óssea entre os grupos SM x NEM. OA, osso alveolar. (Picrosírius, magnificação 200x)

Reabsorção óssea

Na comparação entre os grupos sem movimentação dentária, verificou-se que o grupo S apresentou maior número de osteoclastos do que o grupo N no 28º dia ($p=0,0405$) (Tabela II, Fig 4).

Tabela II. Comparações do número de osteoclastos por μm^2 na relação grupo x tempo

Grupo/Dia	S (Média $\pm$ DP)	N (Média $\pm$ DP)	E (Média $\pm$ DP)	NE (Média $\pm$ DP)	
2 dias	0,000154 $\pm$ 0,000094 ^A	0,000086 $\pm$ 0,000024 ^A	0,000207 $\pm$ 0,000122 ^A	0,000219 $\pm$ 0,000122 ^A	Poder do teste
14 dias	0,000069 $\pm$ 0,000031 ^A	0,000081 $\pm$ 0,000058 ^A	0,000142 $\pm$ 0,000080 ^A	0,000086 $\pm$ 0,000046 ^A	
28 dias	0,000216 $\pm$ 0,000047 ^A	0,000102 $\pm$ 0,000031 ^B	0,000314 $\pm$ 0,000113 ^{AB}	0,000109 $\pm$ 0,000054 ^{AB}	
Grupo/Dia	SM (Média $\pm$ DP)	NM (Média $\pm$ DP)	EM (Média $\pm$ DP)	NEM (Média $\pm$ DP)	
2 dias	0,000159 $\pm$ 0,000104 ^A	0,000187 $\pm$ 0,000096 ^A	0,000319 $\pm$ 0,000130 ^A	0,000178 $\pm$ 0,000076 ^A	0,9999
14 dias	0,000163 $\pm$ 0,000033 ^A	0,000164 $\pm$ 0,000107 ^A	0,000223 $\pm$ 0,000155 ^A	0,000225 $\pm$ 0,000091 ^A	
28 dias	0,000248 $\pm$ 0,000148 ^A	0,000106 $\pm$ 0,000080 ^A	0,000220 $\pm$ 0,000141 ^A	0,000224 $\pm$ 0,000120 ^A	

ANOVA a dois critérios modelo fatorial completo: $p<0,05$

Teste de Games Howell

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas

DP= Desvio padrão

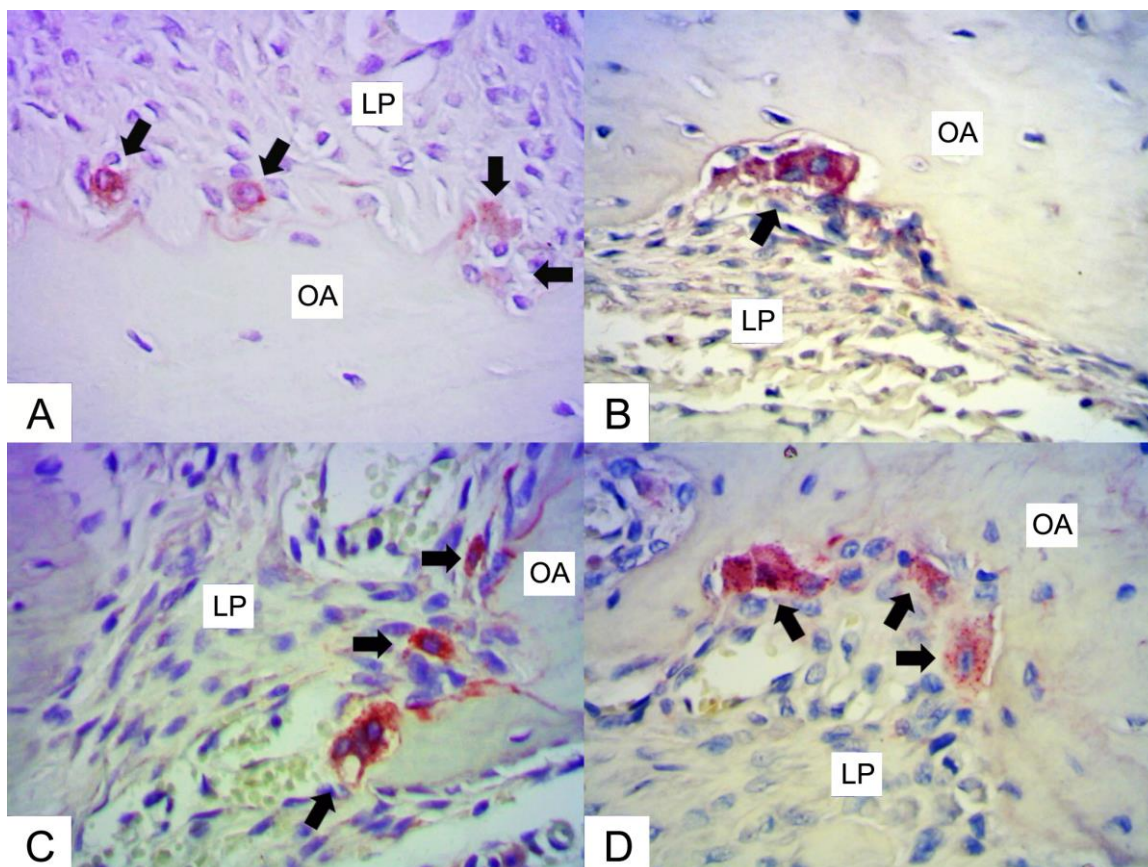


Fig 4. Fotomicrografia de lâminas da área do ligamento periodontal da raiz mesial vestibular do primeiro molar superior direito, dos grupos S (A), N (B) E (C) e NE (D) no 28º dia após instalação do dispositivo ortodôntico, sendo observado maior número de osteoclastos por μm^2 no grupo S quando comparado ao N. OA, osso alveolar; LP, ligamento periodontal, setas pretas indicando células TRAP positivas. (TRAP, magnificação 500x)

Taxa de movimento dentário

Não houve diferença estatisticamente significativa para taxa de movimento dentário na relação grupo x tempo ($p > 0,05$) (Tabela III).

Tabela III. Comparações da variação da taxa de movimento dentário (mm) na relação Grupo x Tempo (Média, desvio padrão e valor de p)

Grupo/Dia	S (Média $\pm$ DP)	N (Média $\pm$ DP)	E (Média $\pm$ DP)	NE (Média $\pm$ DP)
2 dias	0,6833 $\pm$ 0,5845	0,4538 $\pm$ 0,5141	0,9571 $\pm$ 0,6579	0,6933 $\pm$ 0,6649
14 dias	0,3000 $\pm$ 0,2529	0,3000 $\pm$ 0,3012	0,5444 $\pm$ 0,6984	0,4400 $\pm$ 0,4949
28 dias	0,5399 $\pm$ 0,5176	0,3642 $\pm$ 0,3152	0,3889 $\pm$ 0,2713	0,5818 $\pm$ 0,4792
Grupo/Dia	SM x NM (p)	SM x EM (p)	SM x NEM (p)	Poder do teste
2 dias	0,9986	0,9977	1,0000	
14 dias	1,0000	0,9986	1,0000	0,6686
28 dias	0,9999	1,0000	1,0000	

ANOVA a dois critérios modelo fatorial completo: $p > 0,05$

Teste de Tukey

DP= Desvio padrão

Peso corporal

Não houve diferença estatisticamente significativa na interação grupo x tempo ($p>0,05$) (Tabela IV).

Tabela IV. Comparação da variação do peso corporal (g) na relação grupo x tempo

Grupo/Dia	S (Média ± DP)	N (Média ± DP)	E (Média ± DP)	NE (Média ± DP)	Poder do teste
2 dias	-7,83 ± 16,77 ^A	16,57 ± 31,86 ^A	9,85 ± 23,95 ^A	-5,28 ± 20,02 ^A	
14 dias	-20,00 ± 8,79 ^A	9,42 ± 10,92 ^A	-10,57 ± 10,58 ^A	-9,71 ± 8,44 ^A	
28 dias	-12,00 ± 14,05 ^A	-21,00 ± 7,74 ^A	-2,62 ± 19,46 ^A	-10,57 ± 12,35 ^A	
Grupo/Dia	SM (Média ± DP)	NM (Média ± DP)	EM (Média ± DP)	NEM (Média ± DP)	1,0000
2 dias	-3,40 ± 14,09 ^A	17,22 ± 9,89 ^A	11,60 ± 11,52 ^A	9,50 ± 17,05 ^A	
14 dias	-1,80 ± 18,80 ^A	-0,70 ± 15,81 ^A	3,50 ± 22,22 ^A	7,00 ± 14,75 ^A	
28 dias	-0,70 ± 25,50 ^A	6,90 ± 23,88 ^A	30,70 ± 16,89 ^A	25,44 ± 12,66 ^A	

ANOVA a dois critérios modelo fatorial completo: $p<0,05$

Teste de Games Howell

Letras iguais na mesma linha indicam que não houve diferenças estatisticamente significativas

DP = Desvio padrão

DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o efeito do etanol e nicotina sobre a movimentação ortodôntica nos seguintes aspectos: neoformação óssea, reabsorção óssea, taxa de movimento dentário e peso corporal, e foram observadas diferenças para neoformação óssea (SM x NEM) e reabsorção óssea (S x N).

Aproximadamente 90-95% da matriz orgânica do ligamento periodontal é composta por colágeno tipo I, que através do processo de reabsorção óssea causado pela movimentação dentária é degradado e posteriormente reparado pela deposição de fibras imaturas de colágeno tipo III, sendo este remodelado posteriormente para colágeno tipo I.^{8,13,30} No presente estudo o grupo NEM apresentou diminuição significativa no colágeno tipo I no osso alveolar, quando comparado ao grupo SM ($p<0,05$). Estes achados concordaram com os de Soares et. al,¹⁹ onde observaram que animais que receberam solução de etanol a 10% e nicotina 1.25mg/kg pelo período de 4 semanas tiveram efeito negativo sobre a osteogênese ao redor de implantes, entretanto, o etanol associado à nicotina intensificou estes efeitos. Quando avaliado o efeito apenas do etanol (3g/kg) sobre a matriz colágena em ratos submetidos ao movimento dentário, Araujo et al.⁸, não observaram diferenças na porcentagem de colágeno tipo I no osso alveolar ($p\geq 0,05$), sugerindo que o etanol não influenciou no processo de deposição de fibras colágenas. Quando avaliados os dados apenas do efeito da

1 nicotina (2mg/kg) sobre a matriz colágena, Shintcovisk et al.,¹³ observaram que a
2 nicotina retardou o processo de maturação das fibras colágenas depositadas na
3 matriz óssea, entretanto este estudo utilizou o dobro da dosagem utilizada neste
4 estudo. Ghanem et al.,³¹ ao fazerem uma revisão sistemática avaliando o papel
5 da nicotina na osseointegração de implantes, observaram que 62,5% dos estudos
6 revisados demonstraram não haver influência significativa da nicotina sobre a
7 cicatrização ao redor dos implantes. No presente estudo, quando avaliada a
8 interação do etanol com a nicotina, os resultados sugerem que a nicotina
9 associada ao etanol atrasou a maturação do colágeno.

10 Com relação à reabsorção óssea, na presente pesquisa observamos que
11 no 28º dia o grupo N apresentou menor número de osteoclastos quando
12 comparado ao grupo S. Mesmo tendo utilizado dosagem de nicotina diferente da
13 utilizada no presente estudo, Shintcovsk et al.,¹³ observaram que os animais que
14 receberam nicotina (2mg/kg) e foram submetidos à movimentação ortodôntica,
15 apresentaram redução da expressão das células osteoclásticas e das lacunas de
16 Howship. Entretanto no presente estudo quando realizado o movimento dentário,
17 não houve diferença estatística para o número de osteoclastos. Em contraste,
18 Bakathir et al.,¹² utilizando três dosagens (0.37 mg/kg; 0.57 mg/kg; 0.93 mg/kg)
19 observaram maior frequência de células osteoclásticas nos grupos que
20 receberam nicotina, entretanto os autores não apresentaram a quantificação dos
21 dados histológicos, apenas resultados qualitativos. O método de mensuração da
22 reabsorção óssea pode ter influenciado os resultados. Na presente pesquisa foi
23 feita a média de osteoclastos por micrômetro quadrado para evitar o risco de viés
24 relativo à escolha do lado de compressão no ligamento periodontal e osso
25 alveolar. A média de todo ligamento se torna um modelo mais confiável para
26 evitar um resultado falso-positivo ou falso-negativo. Além disto, neste estudo, as
27 variáveis estudadas, incluindo a reabsorção óssea, foram convergentes em seus
28 resultados produzindo uma evidência com maior força, pois todas variáveis
29 apontaram para mesma direção.

30 É de nosso conhecimento que não há na literatura científica nenhum
31 trabalho que tenha avaliado o efeito do etanol e nicotina sobre a taxa de
32 movimentação dentária. Há relatos na literatura apenas da influência destas
33 substâncias de maneira isolada. Sodagar et al.,¹¹ avaliaram a movimentação
34 dentária em ratos utilizando força de 60g/f submetidos a administração de três

dosagens de nicotina (0,5 mg/kg; 0,75 mg/kg; 1 mg/kg), da mesma forma Bakathir et al.,¹² também utilizando outras três dosagens de nicotina associada ao movimento ortodôntico (30g/f), concluíram que após 14 dias de movimentação, a nicotina acelerou o movimento dentário dos ratos, e o efeito foi dose-dependente. Entretanto, houveram diferenças nos desenhos metodológicos destes estudos quando comparados a este, tais como o método de mensuração e o tempo de administração da nicotina, prévia à movimentação ortodôntica. Em relação ao método de mensuração Bakathir et al.,¹² utilizaram paquímetro digital e Sodagar et al.,¹¹ utilizaram medidor de espessura interproximal. No presente estudo optou-se pela realização de moldagens e confecção de modelos de gesso, antes e depois do período de movimentação, para fornecer resultado mais confiável, uma vez que desta forma, os tecidos moles da boca do animal não interferiram na aferição. Outra diferença entre os estudos foi o tempo de aplicação da nicotina, prévia à movimentação ortodôntica. Sodagar et al.¹¹ e Bakathir et al.¹² utilizaram o tempo de 14 dias de aplicação e em nosso estudo optamos por um período maior de aplicação para intensificar o caráter de cronicidade da nicotina no animal. Ghanem et al.,³¹ relata que o período de 6 semanas ou mais, de suplementação de nicotina, é o período ideal para que os efeitos da nicotina sobre o metabolismo ósseo sejam evidenciados nos animais, e em nenhum destes estudos o período de aplicação prévia somado ao período de movimentação, ultrapassaram 4 semanas. Não há nenhum relato na literatura da avaliação da taxa de movimentação dentária sob o efeito do etanol, há apenas um estudo na literatura⁸ e este avaliou apenas aspectos histológicos. Interpretando os resultados da presente pesquisa, a nicotina e o etanol não interferiram na taxa de movimentação dentária.

Não houve diferença na interação grupo x tempo para o peso corporal. O dispositivo ortodôntico instalado na cavidade bucal dos animais pode gerar desconforto ao animal, e dificuldade na ingestão de alimentos com consequente alteração no peso.³² Somado a isto, o etanol e a nicotina quando associadas também podem levar ao menor ganho de peso corporal. Isto foi verificado por Soares et al.,¹⁹ em cujo estudo observaram que o grupo que recebeu nicotina e etanol foi o que menos ganhou peso corporal. Frankham et al., 2003,³³ afirmam que em humanos a saciedade é acelerada pela nicotina, isto pode ocorrer através da influência direta da nicotina, especialmente no sistema dopaminérgico

1 ou pela liberação de leptina. Entretanto, mesmo que relatos indiquem que a
2 nicotina e o etanol possam influenciar na variação do peso do animal, estes
3 fatores não foram suficientes para interferir no peso dos animais.

4 Em muitas partes do mundo o álcool e o tabaco são considerados como
5 drogas lícitas e são amplamente consumidas pela população. Sendo assim é de
6 extrema importância aos ortodontistas o conhecimento da influência destas
7 drogas no movimento ortodôntico, uma vez que baseado em nossos achados,
8 estas podem interferir no metabolismo ósseo através da menor neoformação
9 óssea quando induzido o movimento dentário, e menor número de osteoclastos
10 quando não induzido. Extrapolando para uma situação clínica, este atraso na
11 maturação do colágeno tipo I ou maior degradação, pode indicar ao ortodontista a
12 necessidade de intervalo maior entre consultas, nestes pacientes. Entretanto,
13 apesar de ratos serem um modelo bem estabelecido para avaliação destas
14 substâncias sobre o metabolismo ósseo, estudos em animais se encontram na
15 base da pirâmide de evidência científica, sendo esta uma limitação deste tipo de
16 estudo, e ao mesmo tempo uma recomendação futura para realização de estudos
17 em humanos para fortalecer a evidência dos resultados já encontrados.

18 **CONCLUSÃO**

19 A nicotina e o etanol não interferiram na taxa de movimentação dentária e
20 peso corporal, independente da indução do movimento ortodôntico. A nicotina
21 influenciou o número de osteoclastos, diminuindo a sua quantidade quando não
22 foi induzido o movimento dentário. Quando a nicotina foi associada ao etanol,
23 interferiu negativamente na maturação das fibras colágenas, durante o
24 movimento ortodôntico.

REFERÊNCIAS

1. Ford MM, McCracken AD, Davis NL, Ryabinin AE, Grant KA. Discrimination of ethanol-nicotine drug mixtures in mice: dual interactive mechanisms of overshadowing and potentiation. *Psychopharmacology (Berl)* 2012;224:537-548.
2. Xu H, Wang F, Kranzler HR, Gelernter J, Zhang H. Alcohol and nicotine codependence-associated DNA methylation changes in promoter regions of addiction-related genes. *Sci Rep* 2017;7:41816.
3. Jamal A, King BA, Neff LJ, Whitmill J, Babb SD, Graffunder CM. Current Cigarette Smoking Among Adults - United States, 2005-2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016;65:1205-1211.
4. Nogueira-Filho GR, Froes Neto EB, Casati MZ, Reis SR, Tunes RS, Tunes UR et al. Nicotine effects on alveolar bone changes induced by occlusal trauma: a histometric study in rats. *J Periodontol* 2004;75:348-352.
5. Kirschneck C, Proff P, Maurer M, Reicheneder C, Romer P. Orthodontic forces add to nicotine-induced loss of periodontal bone : An in vivo and in vitro study. *J Orofac Orthop* 2015;76:195-212.
6. Sloan A, Hussain I, Maqsood M, Eremin O, El-Sheemy M. The effects of smoking on fracture healing. *Surgeon* 2010;8:111-116.
7. Kallala R, Barrow J, Graham SM, Kanakaris N, Giannoudis PV. The in vitro and in vivo effects of nicotine on bone, bone cells and fracture repair. *Expert Opin Drug Saf* 2013;12:209-233.
8. de Araujo CM, Johann AC, Camargo ES, Tanaka OM. The effects of binge-pattern alcohol consumption on orthodontic tooth movement. *Dental Press J Orthod* 2014;19:93-98.
9. Mikosch P. Alcohol and bone. *Wien Med Wochenschr* 2014;164:15-24.
10. Wipfli H, Samet JM. Global economic and health benefits of tobacco control: part 1. *Clin Pharmacol Ther* 2009;86:263-271.
11. Sodagar A, Donyavi Z, Arab S, Kharrazifard MJ. Effect of nicotine on orthodontic tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2011;139:e261-265.
12. Bakathir MA, Linjawi AI, Omar SS, Aboqura AB, Hassan AH. Effects of nicotine on bone during orthodontic tooth movement in male rats. Histological and immunohistochemical study. *Saudi Med J* 2016;37:1127-1135.
13. Shintcovsk RL, Knop L, Tanaka OM, Maruo H. Nicotine effect on bone remodeling during orthodontic tooth movement: histological study in rats. *Dental Press J Orthod* 2014;19:96-107.
14. Windle M. Alcohol use among adolescents and young adults. *Alcohol Res Health* 2003;27:79-85.
15. Lauing K, Himes R, Rachwalski M, Strotman P, Callaci JJ. Binge alcohol treatment of adolescent rats followed by alcohol abstinence is associated with site-specific differences in bone loss and incomplete recovery of bone mass and strength. *Alcohol* 2008;42:649-656.
16. Rolland B, Naassila M. Binge Drinking: Current Diagnostic and Therapeutic Issues. *CNS Drugs* 2017;31:181-186.
17. Barcia JM, Portoles S, Portoles L, Urdaneta AC, Ausina V, Perez-Pastor GM et al. Does Oxidative Stress Induced by Alcohol Consumption Affect Orthodontic Treatment Outcome? *Front Physiol* 2017;8:22.
18. Pereira Vasconcelos DF, Dias da Silva MA, Rocha Marques M, Gibilini C, Cardoso Guimaraes Vasconcelos AC, Pereira Barros S. Effects of simultaneous

- 1 nicotine and alcohol use in periodontitis progression in rats: A histomorphometric
2 study. *J Clin Exp Dent* 2013;5:e95-99.
- 3 19. Soares EV, Favaro WJ, Cagnon VH, Bertran CA, Camilli JA. Effects of alcohol
4 and nicotine on the mechanical resistance of bone and bone neoformation around
5 hydroxyapatite implants. *J Bone Miner Metab* 2010;28:101-107.
- 6 20. Gubner NR, Phillips TJ. Effects of nicotine on ethanol-induced locomotor
7 sensitization: A model of neuroadaptation. *Behav Brain Res* 2015;288:26-32.
- 8 21. Canadian Council on Animal Care. Guide to the Care and Use of
9 Experimental Animals 1997;1:2.
- 10 22. Lieber CS. Alcohol and the liver: metabolism of alcohol and its role in hepatic
11 and extrahepatic diseases. *Mt Sinai J Med* 2000;67:84-94.
- 12 23. Nociti FH, Jr., Nogueira-Filho GR, Tramontina VA, Machado MA, Barros SP,
13 Sallum EA et al. Histometric evaluation of the effect of nicotine administration on
14 periodontal breakdown: an in vivo study. *J Periodontal Res* 2001;36:361-366.
- 15 24. Favaro WJ, Cagnon VH. Morphometric and morphological features of the
16 ventral prostate in rats submitted to chronic nicotine and alcohol treatment. *Tissue*
17 *Cell* 2006;38:311-323.
- 18 25. Franzon Frigotto GC, Miranda de Araujo C, Guariza Filho O, Tanaka OM,
19 Batista Rodrigues Johann AC, Camargo ES. Effect of fluoxetine on induced
20 tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2015;148:450-456.
- 21 26. Brunet MD, Araujo CM, Johann AC, Camargo ES, Tanaka OM, Guariza OF.
22 Effects of Zoledronic Acid on Orthodontic Tooth Movement in Rats. *Braz Dent J*
23 2016;27:515-523.
- 24 27. Borges MA, Matos IC, Dias KR. Influence of two self-etching primer systems
25 on enamel adhesion. *Braz Dent J* 2007;18:113-118.
- 26 28. Rudolph DJ, Willes PMG, Sameshima GT. A finite element model of apical
27 force distribution from orthodontic tooth movement. *Angle Orthod* 2001;71:127-
28 131.
- 29 29. Eriksen EF, Charles P, Melsen F, Mosekilde L, Risteli L, Risteli J. Serum
30 markers of type I collagen formation and degradation in metabolic bone disease:
31 correlation with bone histomorphometry. *J Bone Miner Res* 1993;8:127-132.
- 32 30. Ghanem A, Abduljabbar T, Akram Z, Vohra F, Kellesarian SV, Javed F. A
33 systematic review and meta-analysis of pre-clinical studies assessing the effect of
34 nicotine on osseointegration. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2017.
- 35 31. King GJ, Keeling SD, McCoy EA, Ward TH. Measuring dental drift and
36 orthodontic tooth movement in response to various initial forces in adult rats. *Am J*
37 *Orthod Dentofacial Orthop* 1991;99:456-465.
- 38 32. Frankham P, Cabanac M. Nicotine lowers the body-weight set-point in male
39 rats. *Appetite* 2003;41:1-5.

1 **ARTIGO 1 - VERSÃO EM INGLÊS**

2 **EFFECT OF ETHANOL AND NICOTINE ON ORTHODONTIC TOOTH**
3 **MOVEMENT IN RATS**

4 **Cristiano Miranda de Araujo**, DDs, Ms

5 Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil

6 School of Life Sciences

7 Postgraduate Program in Dentistry - Orthodontics

8 Email : cristiano.m.araujo@hotmail.com

9

10 **Elisa Souza Camargo**, DDs, Ms, PhD

11 Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil

12 School of Life Sciences

13 Postgraduate Program in Dentistry - Orthodontics

14 Email : escamargo@uol.com.br

15

16 **Corresponding author:**

17 **Elisa Souza Camargo**

18 Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil

19 School of Life Sciences

20 Postgraduate Program in Dentistry - Orthodontics

21 Address: Street Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho

22 Zip code: 80215-901 Curitiba, Paraná, Brazil

23 Phone: 55 41 3271-1637/Fax 55 41 3271-1405

24 Email : escamargo@uol.com.br

25

ABSTRACT

Introduction: The aim of this study was to evaluate the effect of nicotine (1 mg/kg) and ethanol (3 g/kg) on bone formation and reabsorption, tooth movement rate, and body weight during rat tooth movement. **Methods:** A total of 200 rats were divided into eight groups: S: saline without tooth movement (n = 15); N: nicotine without tooth movement (n = 25); E: 20% ethanol without tooth movement (n = 25); NE: nicotine and ethanol 20% without tooth movement (n = 25); SM: saline with tooth movement (n = 30); NM: nicotine with tooth movement (n = 30); EM: ethanol 20% with tooth movement (n = 30); and NEM: nicotine and ethanol 20% with tooth movement (n = 30). Nicotine and saline were administered once per day, every day; ethanol administration mimicked the binge pattern. All solutions were applied for 32, 44, or 58 days according to the subgroup. Orthodontic movement (25 cN) was initiated 30 days after solution administrations in the groups with tooth movement. The rats were euthanized 2, 14, or 28 days after initiation of tooth movement. Tooth sections were stained using picrosirius techniques and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP). The tooth movement rate was measured in plaster models, and animal weights were measured weekly. Data were compared by ANOVA using two methods: Tukey's HSD and Games-Howell. **Results:** On day 28 of tooth movement, the NEM group had a lower percentage of Type I collagen compared to the SM group ($p = 0.0448$), and the S group at day 28 had a higher number of osteoclasts/ μm^2 in the periodontal ligament compared to the N group ($p = 0.0405$). **Conclusions:** Ethanol associated with nicotine delayed the maturation of collagen fibers when tooth movement was induced. When tooth movement was not induced, nicotine decreased numbers of osteoclasts in the periodontal ligament.

Key words: Nicotine, Ethanol, Tooth movement, Orthodontics.

1 INTRODUCTION

2 The abuse of alcohol and nicotine is relatively common; the substances
3 occupy the first and third positions in the ranking of preventable causes of death
4 in the United States,¹⁻³ with more than 480.000 and 80.000 deaths per year,
5 respectively.² Nicotine is one of approximately two thousand substances with toxic
6 potential in cigarette smoke⁴ and has been identified as the most important
7 promoter of tobacco-induced pathogenic effects on the periodontium,⁵ a risk factor
8 for osteoporosis, and a substance that hinders the repair of bone fractures.^{6,7}
9 Ethanol is the main component of alcoholic beverages, is considered toxic to
10 bones,⁸ and promotes several direct effects on the activity of bone cells, such as
11 inhibition of the differentiation of the mesenchymal cells in the bone marrow into
12 osteoblasts and the growth of osteoblastic cells.⁹

13 Although smoking risks have been known for decades, there are an
14 estimated 1.3 billion smokers worldwide.¹⁰ Studies indicate that nicotine plays an
15 important role in bone metabolism. Sodagar et al.¹¹ evaluated the rate of tooth
16 movement in rats subjected to 28 days of nicotine application and observed that
17 after 14 days of movement, nicotine accelerated tooth movement of these animals
18 and the effect was dose-dependent. Bakathir et al.¹² also applied nicotine for 28
19 days, orthodontic movement was performed for 14 days and nicotine accelerated
20 the orthodontic movement, generating an imbalance between reabsorption and
21 bone neoformation. However, Shintcovsk et al.¹³ evaluated the effect of 2 mg/kg
22 nicotine on tooth movement in rats in a histological study and observed that
23 nicotine affected bone remodeling; reduced angiogenesis, osteoclasts, and
24 Howship's lacunae; and delayed collagen maturation in the bone matrix.

25 Alcohol is widely consumed around the world, involving different socio-
26 cultural contexts. Alcohol abuse is a public health problem in the United States,
27 and dangerous drinking practices are presented among adolescent and young
28 adult populations; the binge consumption pattern is most common in these age
29 groups.^{14,15} According to Rolland et al.,¹⁶ the definition of the "binge consumption
30 pattern" varies in the scientific literature depending on the author or institution.
31 However, the National Institute of Alcoholism and Alcohol Abuse (NIAAA), a
32 branch of the United States Department of Health, defines it as a pattern of
33 alcohol consumption that results in high serum levels of ethyl alcohol, which

usually occurs after 4 drinks for women and 5 drinks for men in approximately 2 hours. Thus, it is not only a high serum concentration, but also the association with a short time period.¹⁶ Barcia et al.,¹⁷ through a bibliographical review on the effect of ethanol on orthodontics, mentioned that despite the fact that several studies have indicated the potential deleterious effects of ethanol on periodontal and alveolar bone, there is only one work in the scientific literature on the effects of ethanol on tooth movement. This unique study was conducted by Araujo et al.⁸ using a dose of 3 g/kg/day of 20% ethanol in rats that mimicked the binge pattern of ethanol consumption. The study evaluated the effect on orthodontic movement and observed a decrease in bone resorption on day 28 of orthodontic movement.

Nicotine and alcohol are detrimental to the integrity of bone tissue when consumed separately. When combined, these effects may be intensified.¹⁸ Soares et al.¹⁹ observed rats receiving a diluted 10% ethanol solution and 1.25 mg/kg nicotine for 4 weeks and reported a reduction of osteogenesis around implants and decreased mechanical resistance of the bone. There is no scientific work in the literature that has evaluated the combined effect of these substances on tooth movement.

In orthodontic practice, the prevalence of smokers in orthodontic treatment represents on average 26% of adults and 12% of adolescents.⁵ According to data from the American Association of Orthodontists, from 1994 to 2010 the percentage of adults who used orthodontic appliances increased from 680,000 to 1.1 million per year (58%). According to Barcia et al.,¹⁷ many of them used ethanol at some point during orthodontic treatment. As the excessive consumption of alcoholic beverages is highly correlated with smoking,²⁰ it is extremely important to know the effects of these two substances on orthodontic movement.

Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of nicotine and ethanol on tooth movement in rats in the following aspects: bone neoformation, bone resorption, tooth movement rate, and body weight.

MATERIAL AND METHODS

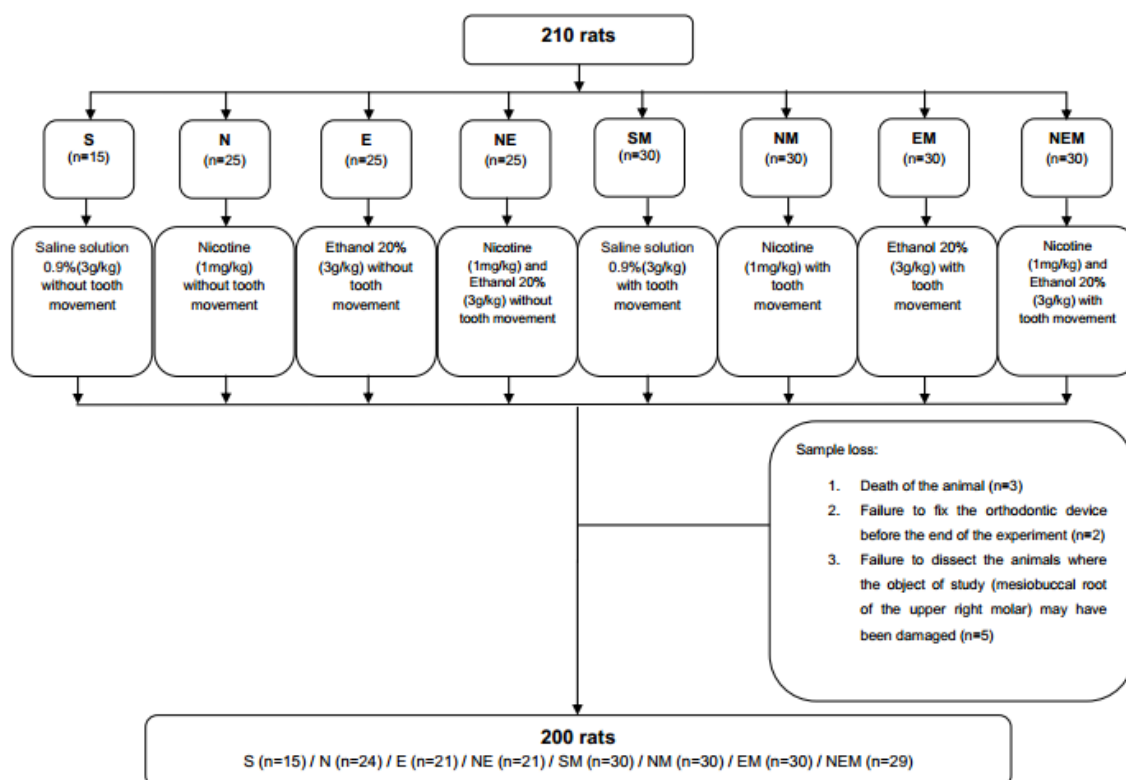
The present work was approved by the PUCPR Committee of Ethics in the Use of Animals (#778/#779).

Sample

The initial sample consisted of 210 male *Wistar* rats (*Rattus norvegicus albinus*) approximately 9 weeks of age weighing 300-350 g. The animals were provided and maintained by the PUCPR vivarium; all care relating to hygiene, lighting, ventilation, and feeding followed the recommendations and ethical guidelines of the Canadian Council on Animal Care.²¹

The animals were fed water and feed ad libitum throughout the experiment. Before the installation of the devices for dental movement, the feed was supplied in a solid consistency. After the installation of the devices, crushed feed was provided to prevent possible damage to the orthodontic apparatus and to facilitate the feeding of the animals. The temperature was controlled to between 19° and 22°C and the photoperiod was 12 h of light and 12 h of darkness. Feeding, temperature, and housing conditions were identical for all rats, and all remained in the same vivarium.

The animals were randomized into 8 groups (Fig 1). Group S had a smaller sample size due to issues involving the release of animals by the ethics committee.



The 20% ethanol was administered intraperitoneally at a dose of 3 g/kg^{8,22} that mimicked the binge pattern of ethanol consumption: administration for 4

consecutive days followed by 3 days of abstinence.^{8,23} The nicotine (nicotine hemisulphate, Sigma-Aldrich Chemicals Pvt. Ltd., St. Louis, MO, USA) had been previously prepared and was diluted in 0.9% saline, homogenized, and subcutaneously administered at a dose of 1 mg/kg^{11,19,24,25} on the dorsa every day until the day of euthanasia. The saline solution was administered in a volume and at a periodicity similar to the groups receiving experimental solutions. The role of saline application was to avoid interference bias of the stress generated during the application. All solutions were applied once daily for 32, 44, or 58 days, according to each subgroup. The orthodontic movement began after 30 days of application to the groups with tooth movement.

As the solution applied was not similar in all groups, it was not possible to blind the investigator who administered the solutions to the animals. However, the researcher was blinded when performing the measurements, making any bias in analysis of the research outcomes impossible.

The rats were weighed weekly using a precision electronic balance (Gehaka-BG 4001, São Paulo, Brazil) to adjust the dose of the administered substances. Body weight variation was calculated using the formula:

$$\text{Body weight change} = \text{Initial weight} - \text{Final weight}$$

Animals were euthanized, according to subgroup, after 32, 44, or 58 days of substance administration, and 2, 14, or 28 days of tooth movement in groups with orthodontic appliances. All animals were euthanized by anesthetic overdose (270 mg/kg ketamine and 30 g/kg xylazine) administered intraperitoneally.

Tooth movement

The induction of tooth movement was performed through an orthodontic device^{8,26,27} consisting of a nickel-titanium spring (Dentsply GAC, Dentsply Sirona, Islandia, NY, USA). Stainless steel 0.025-mm ligature wire (Dental Morelli Ltd., São Paulo, SP, Brazil) was used to attach the spring to the first right maxillary molar and central incisors and to transmit a reciprocal force of 25 cN.²⁶ The force was measured by a dynamometer (Haag-Streit AG, Koeniz, Switzerland) that had been previously calibrated. The tip of the ligament was fixed to the upper right incisor, and the ligature was attached to the tooth with composite resin (Charisma,

Heraeus, Hanau, Germany). To increase the stability of the device, the upper left incisor was also coated with resin. After initial activation, the spring was not reactivated during the experimental period. However, the positioning was checked daily.

Histotechnical processing

After euthanasia of the animals, the right hemimaxils were removed, stored in 10% formaldehyde for 24 h, and demineralized with 5% ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) (Biotec Analytical Reagents, Pinhais, Brazil), for 2 months. After demineralization, specimens were processed and embedded in paraffin in the PUCPR experimental pathology laboratory.

Six 4- μ m thick transverse sections were taken from each tooth, for each staining, from the cervical third of the mesiobuccal root of the upper first molar. Teeth were cut using a microtome, with the occlusal surface of the molar parallel to the microtome and with a 60- μ m interval between each section. Totalling 1200 sections for each staining. The sections were stained by picrosirius techniques and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP).

New bone formation was verified through picrosirius staining. An area of the bone adjacent to the side where the fibers were most stretched was chosen for evaluation, as during orthodontic movement the bone is deposited on the alveolar wall of the traction side. Images were taken using an Olympus BX-50 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) with a polarized Olympus® U-Pot lens (Olympus, Tokyo, Japan) and coupled to a Dinolite® microcamera (AmMo Electronics Corporation, New Taipei City 241, Taiwan) with a magnification of 200 $\times$. The images were evaluated using the Image-Pro Plus 4.5 image analyzer (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA), which measured the percentage of the area of mature and immature collagen in the alveolar bone.²⁸ Type I collagen (mature collagen) presented as a red-orange color; type III collagen (immature) presented as green-yellow.²⁸ The percentage of collagen for each animal was obtained by the average of the 6 sections.

In the sections stained by TRAP, bone resorption was evaluated by the number of osteoclasts per square micrometer (μm^2) in the periodontal ligament. This enzyme is considered a marker of osteoclastic cells, allowing quantification

of bone resorption. In this way, multinucleated TRAP-positive cells in the periodontal ligament adjacent to the alveolar bone were considered to be functional osteoclasts and were quantified.¹³ For quantification, images of all periodontal ligaments with TRAP-positive cells were captured using an Olympus BX-50 microscope coupled to the Dinolite[®] microcamera at a magnification of 400×. To obtain the mean of osteoclasts per square micron, an image of the whole ligament was captured with the same microscope and microcamera at a magnification of 50×, and the area of the entire periodontal ligament was quantified using the "count and measure objects" tool of the Image Pro-Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) morphometry program. For quantification of osteoclasts, the images were analyzed in the Image Pro-Plus 4.5 morphometry program in which a grid for osteoclast counting was applied. After obtaining number of TRAP-positive cells in all the ligaments and area of the periodontal ligament, the mean number of osteoclasts/ μm^2 in the periodontal ligament was calculated using the following formula:

$$(Total\ number\ of\ TRAP\text{-}positive\ cells)/(Periodontal\ ligament\ area)$$

It is unanimous in the scientific literature that different force vectors create different stresses along the root. No tooth has the ideal shape and proportion, and linearity assumptions about the distribution of force in hard and soft tissues are problematic.²⁹ For this reason, the use of the mean osteoclasts per square micrometer (TRAP) and the choice of bone to be evaluated based on the location where the fibers are most stretched (picosirius) avoids the measurement bias, as the distribution of tension and compression forces will vary according to the height assessed on the long axis of the root.

Measurements for each variable were made by a single trained and calibrated evaluator. To demonstrate the reproducibility of the measurements and the intra-examiner calibration, 30% of the samples were remeasured 21 days after the first measurement using the Dahlberg error and Student's *t*-test. The result of the Dahlberg error was 1.36%, indicating that the evaluator reliably reproduced the measurement. To evaluate systematic error, the mean of the variables at the two moments was compared using the Student's *t*-test for paired samples. The

test result indicated that there was no statistically significant difference between the mean values of the variable in the two moments.

Variation of tooth movement

Variation of tooth movement was evaluated by molding the upper dental arch of the rats before orthodontic device installation and at the end of the experiment shortly after euthanasia. To make each mold, the animal was anesthetized with sodium pentobarbital (Syntec, Cotia, Brazil) and molded with polydimethylsiloxane-based condensation silicone (Vigodent Coltene, Rio de Janeiro, Brazil). The models were made with gypsum type IV (Durone IV Gesso Pedra, Dentsply Sirona, Petrópolis, Brazil) (Fig 2).

The distance between the most palato-cervical point of the upper right incisor to the most mesiocervical point of the first right upper molar was measured using a digital caliper (Absolute, Mitutoyo, Kawasaki-Shi, Japan). The tooth movement was calculated using the formula:

$$\text{Variation of tooth movement} = \text{Initial Distance} - \text{Final Distance}$$

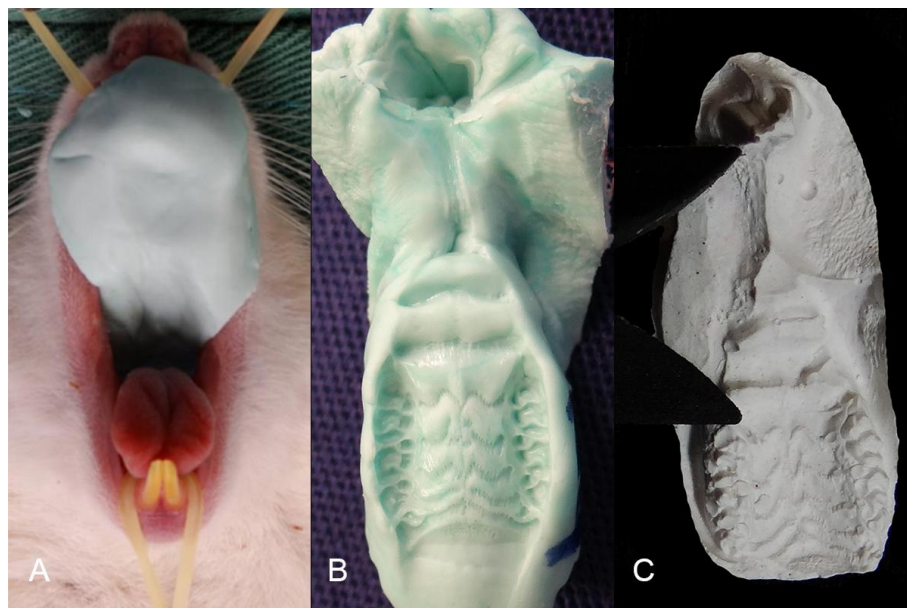


Fig 2. Photograph of the molding procedure of the animal with condensation silicone (A), confection of molds (B) and measuring the distance of the palatal face of the upper right incisor to the mesial surface of the first upper right molar, with the aid of digital caliper (C).

The researcher was blinded for the measurement of all research outcomes by classifying the animals by numbers, so that he did not know the animal's

group. Blinding precluded any bias in the selection of results or influence in the evaluated outcomes.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS for Windows (Version 23.0, IBM Corp., Armonk, NY, USA). A p-value < 0.05 was considered significant.

The normality of the data was tested using the Shapiro-Wilk test. In the sequence, the homogeneity of the variances between different treatments was tested using the Levene variance homogeneity test.

Once the groups showed a normal distribution ($p > 0.05$), the comparison of the mean values according to group and time were performed using the parametric ANOVA test with two criteria in a complete factorial model. When ANOVA indicated a difference, and when the treatments presented variance heterogeneity ($p < 0.05$), the comparison of treatments 2 to 2 was made through the parametric multiple comparisons test for heterogeneous Games-Howell variances. Tukey's multiple comparisons test was used for homogeneous variances. For each of the dependent variables according to group $\times$ time, the power observed for each factor and for the group $\times$ time interaction (power test) was calculated.

RESULTS

Bone neoformation

On day 28 of tooth movement, the NEM group presented a lower percentage of Type I collagen than the SM group ($p = 0.0448$) (Table I, Fig 3).

Table I. Comparisons of the variable percentage of type I collagen (%) in relation group $\times$ time (Mean and Standard deviation)

Group/Day	S (Mean $\pm$ SD)	N (Mean $\pm$ SD)	E (Mean $\pm$ SD)	NE (Mean $\pm$ SD)	Power Test
2 days	97.45 $\pm$ 2.44 ^A	97.79 $\pm$ 0.90 ^A	92.89 $\pm$ 3.20 ^A	95.29 $\pm$ 2.86 ^A	
14 days	93.45 $\pm$ 3.59 ^A	90.01 $\pm$ 4.70 ^A	94.44 $\pm$ 1.85 ^A	95.85 $\pm$ 1.14 ^A	
28 days	96.35 $\pm$ 2.63 ^A	93.33 $\pm$ 6.94 ^A	98.41 $\pm$ 1.20 ^A	97.77 $\pm$ 1.24 ^A	
Group/Day	SM (Mean $\pm$ SD)	NM (Mean $\pm$ SD)	EM (Mean $\pm$ SD)	NEM (Mean $\pm$ SD)	1.000
2 days	86.94 $\pm$ 8.04 ^A	93.95 $\pm$ 5.62 ^A	73.49 $\pm$ 13.66 ^A	91.59 $\pm$ 7.17 ^A	
14 days	87.61 $\pm$ 11.47 ^A	89.18 $\pm$ 5.83 ^A	84.49 $\pm$ 9.41 ^A	93.02 $\pm$ 8.28 ^A	
28 days	91.60 $\pm$ 7.08 ^A	85.88 $\pm$ 7.19 ^{AB}	80.25 $\pm$ 11.03 ^{AB}	77.20 $\pm$ 7.35 ^B	

Two-way ANOVA full factorial design: $p < 0.05$

* Significance level of the Games-Howell test was: $p < 0.05$

Different letters in the same line indicate statistically significant differences.

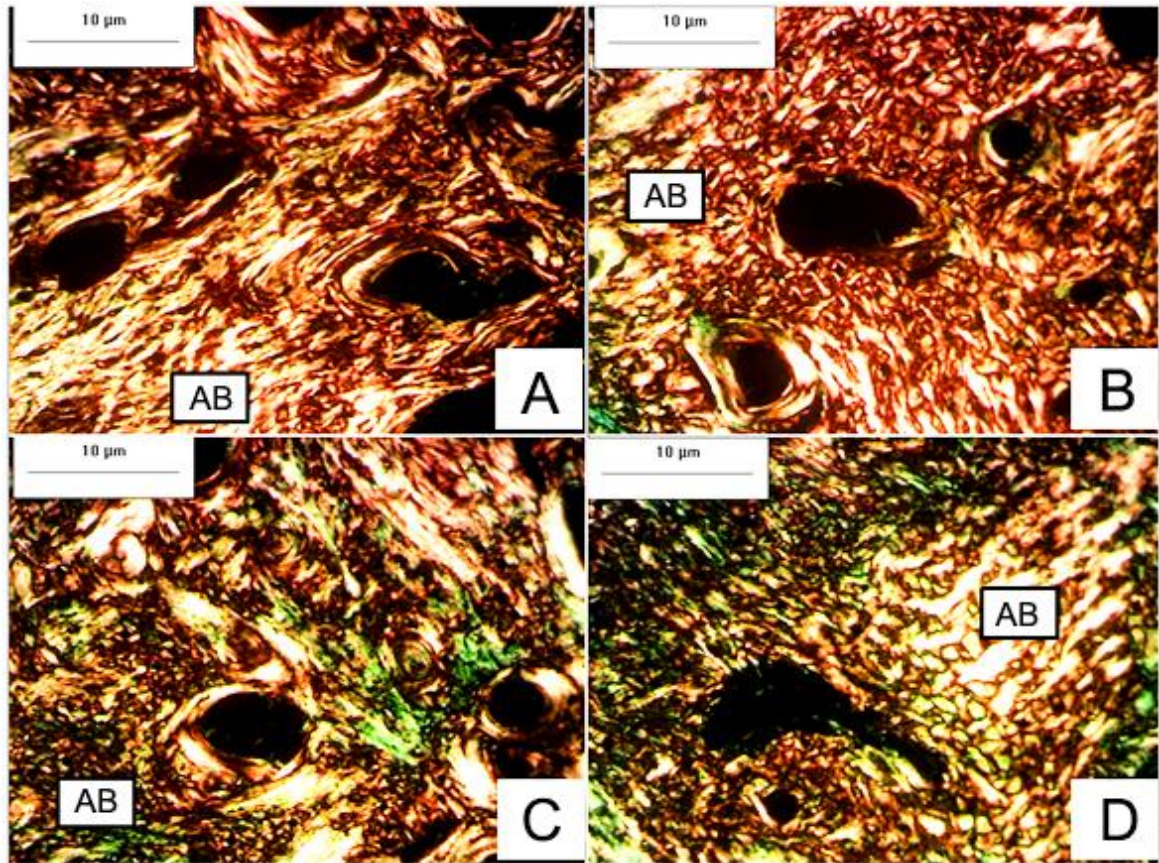


Fig 3. Photomicrograph blade of the alveolar bone of the mesiobuccal root of the maxillary right first molar. SM (A), NM (B), EM (C) and NEM (D) on the 28th day after installation of the orthodontic device. There were differences in bone formation between the SM x NEM groups. AB indicates alveolar bone. Picrosirius staining was at a magnification of 200×

Bone resorption

In the comparison of groups without tooth movement, it was verified that group S had a greater number of osteoclasts than group N on day 28 ($p = 0.0405$) (Table II, Fig 4).

Table II. Comparisons of the number of osteoclasts per μm^2 in relation group x time (Mean and Standard deviation)

Group/Day	S (Mean $\pm$ SD)	N (Mean $\pm$ SD)	E (Mean $\pm$ SD)	NE (Mean $\pm$ SD)	
2 days	0,000154 $\pm$ 0,000094 ^A	0,000086 $\pm$ 0,000024 ^A	0,000207 $\pm$ 0,000122 ^A	0,000219 $\pm$ 0,000122 ^A	Power Test
14 days	0,000069 $\pm$ 0,000031 ^A	0,000081 $\pm$ 0,000058 ^A	0,000142 $\pm$ 0,000080 ^A	0,000086 $\pm$ 0,000046 ^A	
28 days	0,000216 $\pm$ 0,000047 ^A	0,000102 $\pm$ 0,000031 ^B	0,000314 $\pm$ 0,000113 ^{AB}	0,000109 $\pm$ 0,000054 ^{AB}	
Group/Day	SM (Mean $\pm$ SD)	NM (Mean $\pm$ SD)	EM (Mean $\pm$ SD)	NEM (Mean $\pm$ SD)	
2 days	0,000159 $\pm$ 0,000104 ^A	0,000187 $\pm$ 0,000096 ^A	0,000319 $\pm$ 0,000130 ^A	0,000178 $\pm$ 0,000076 ^A	0,9999
14 days	0,000163 $\pm$ 0,000033 ^A	0,000164 $\pm$ 0,000107 ^A	0,000223 $\pm$ 0,000155 ^A	0,000225 $\pm$ 0,000091 ^A	
28 days	0,000248 $\pm$ 0,000148 ^A	0,000106 $\pm$ 0,000080 ^A	0,000220 $\pm$ 0,000141 ^A	0,000224 $\pm$ 0,000120 ^A	

Two-way ANOVA full factorial design: $p < 0,05$

* Significance level of the Games-Howell test was: $p < 0.05$

Different letters in the same line indicate statistically significant differences.

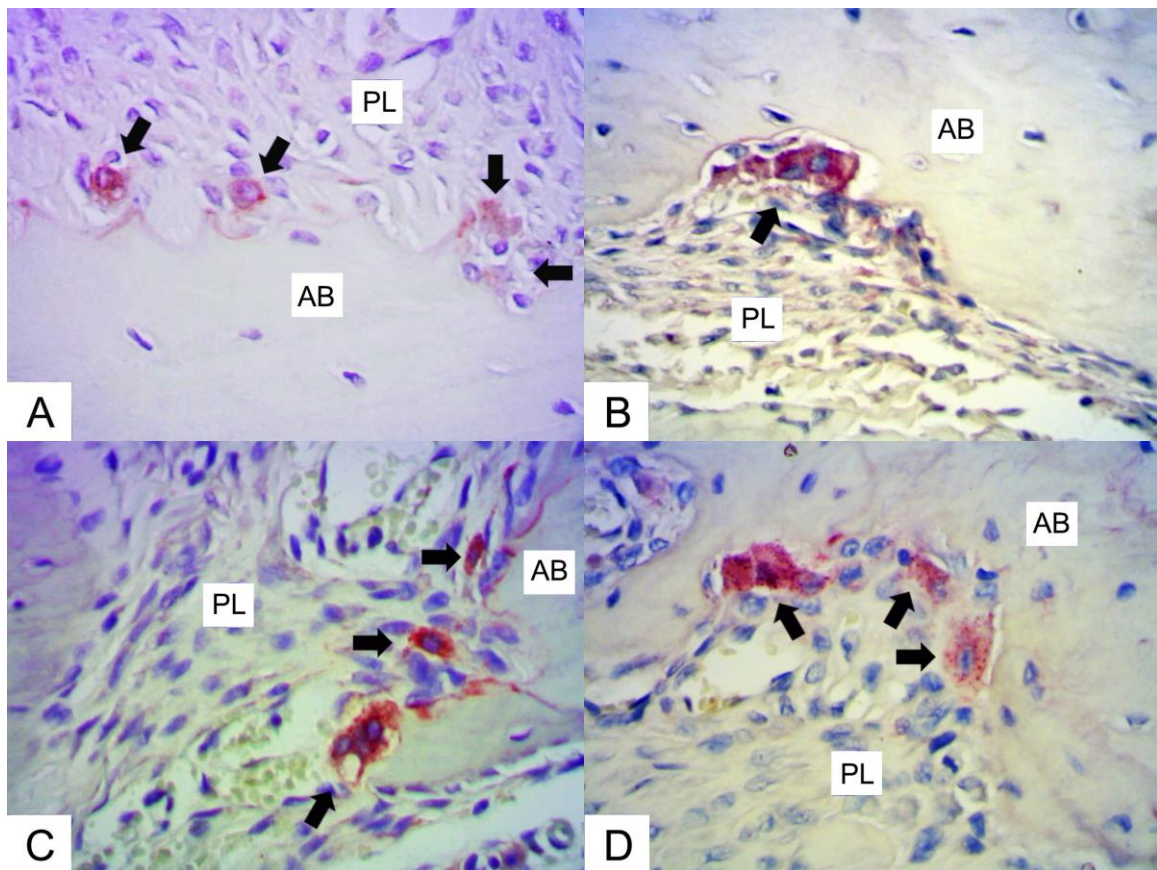


Fig 4. Photomicrograph blade of area of the periodontal ligament of the buccal mesial root of the first right upper molar, the groups S (A), N (B) E (C) e NE (D) on the 28th day after installation of the orthodontic device, with a lower number of osteoclasts per μm^2 in group N when compared to S. AB, alveolar bone; PL, periodontal ligament, Black arrows indicate TRAP-positive cells. (TRAP, magnification 500x)

Rate of tooth movement

There was no statistically significant difference in tooth movement variation in the group $\times$ time relationship ($p > 0.05$) (Table III).

Table III. Comparisons of the varying tooth displacement rate (mm) in relation group $\times$ time (Mean, Standard deviation and p value)

Group/Day	SM (Mean $\pm$ SD)	NM (Mean $\pm$ SD)	EM (Mean $\pm$ SD)	NEM (Mean $\pm$ SD)
2 days	0,6833 $\pm$ 0,5845	0,4538 $\pm$ 0,5141	0,9571 $\pm$ 0,6579	0,6933 $\pm$ 0,6649
14 days	0,3000 $\pm$ 0,2529	0,3000 $\pm$ 0,3012	0,5444 $\pm$ 0,6984	0,4400 $\pm$ 0,4949
28 days	0,5399 $\pm$ 0,5176	0,3642 $\pm$ 0,3152	0,3889 $\pm$ 0,2713	0,5818 $\pm$ 0,4792
Group/Day	SM x NM (p)	SM x EM (p)	SM x NEM (p)	Power Test
2 days	0,9986	0,9977	1,0000	0,6686
14 days	1,0000	0,9986	1,0000	
28 days	0,9999	1,0000	1,0000	

Two-way ANOVA full factorial design: $p > 0,05$

* Significance level of the Tukey's Test was: $p < 0.05$

Body Weight

There was no statistically significant difference in group $\times$ time interaction ($p > 0.05$) (Table IV).

Table IV. Means and standard deviations of body weight changes in relation group $\times$ time (Mean and Standard deviation)

Group/Day	S (Mean $\pm$ SD)	N (Mean $\pm$ SD)	E (Mean $\pm$ SD)	NE (Mean $\pm$ SD)	
2 days	-7,83 $\pm$ 16,77 ^A	16,57 $\pm$ 31,86 ^A	9,85 $\pm$ 23,95 ^A	-5,28 $\pm$ 20,02 ^A	Power Test
14 days	-20,00 $\pm$ 8,79 ^A	9,42 $\pm$ 10,92 ^A	-10,57 $\pm$ 10,58 ^A	-9,71 $\pm$ 8,44 ^A	
28 days	-12,00 $\pm$ 14,05 ^A	-21,00 $\pm$ 7,74 ^A	-2,62 $\pm$ 19,46 ^A	-10,57 $\pm$ 12,35 ^A	
Group/Day	S (Mean $\pm$ SD)	N (Mean $\pm$ SD)	E (Mean $\pm$ SD)	NE (Mean $\pm$ SD)	
2 days	-3,40 $\pm$ 14,09 ^A	17,22 $\pm$ 9,89 ^A	11,60 $\pm$ 11,52 ^A	9,50 $\pm$ 17,05 ^A	1,0000
14 days	-1,80 $\pm$ 18,80 ^A	-0,70 $\pm$ 15,81 ^A	3,50 $\pm$ 22,22 ^A	7,00 $\pm$ 14,75 ^A	
28 days	-0,70 $\pm$ 25,50 ^A	6,90 $\pm$ 23,88 ^A	30,70 $\pm$ 16,89 ^A	25,44 $\pm$ 12,66 ^A	

Two-way ANOVA full factorial design: $p < 0,05$

* Significance level of the Games-Howell test was: $p < 0.05$

Different letters in the same line indicate statistically significant differences.

DISCUSSION

The present study evaluated the following aspects of the effects of ethanol and nicotine on orthodontic movement: bone neoformation, bone resorption, tooth movement rate, and body weight. Differences were observed in bone neoformation (SM $\times$ NEM) and bone resorption (S $\times$ N).

Approximately 90-95% of the organic matrix of the periodontal ligament is composed of type I collagen, which, through the process of bone resorption caused by tooth movement, is degraded and subsequently repaired by the deposition of immature type III collagen fibers, this being subsequently remodeled to type I collagen.^{8,13,30} In our study, the NEM group showed a significant decrease in type I collagen in the alveolar bone when compared to the SM group ($p < 0.05$). Our findings agreed with those of Soares et al.,¹⁹ who observed that administration of a 10% ethanol solution and 1.25 mg/kg nicotine for 4 weeks had a negative effect on osteogenesis around implants of study animals. However, ethanol associated with nicotine intensified the effects. Araujo et al.⁸ evaluated only the effect of ethanol (3 g/kg) on the collagen matrix in rats subjected to tooth movement and did not observe differences in the percentage of collagen type I in the alveolar bone ($p \geq 0.05$), suggesting that ethanol did not influence the deposition process of collagen fibers. Shintcovisk et al.¹³ evaluated the effect of nicotine (2 mg/kg) on the collagen matrix; they observed that nicotine delayed maturation of collagen fibers deposited in the bone matrix. However, this study used twice the dosage of the present study. Ghanem et al.³¹ performed a

1 systematic review to evaluate the role of nicotine in the osseointegration of
2 implants. They found that 62.5% of the studies reviewed showed no significant
3 influence of nicotine on the healing around implants. In the present study, when
4 we evaluated the interaction of ethanol with nicotine, our results suggest that
5 nicotine associated with ethanol delayed the maturation of collagen and/or
6 increased the degradation of type I collagen.

7 Regarding bone resorption, in the present study we observed that on day
8 28, group N had a lower number of osteoclasts when compared to group S.
9 Although the nicotine dosage was different from that used in the present study,
10 Shintcovsk et al.¹³ observed that animals that received 2 mg/kg nicotine and were
11 subjected to orthodontic movement had reduced expression of osteoclastic cells
12 and Howship's lacunae. However, when tooth movement was performed in the
13 present study, there was no statistical difference in the number of osteoclasts. In
14 contrast, Bakathir et al.¹² used three dosages (0.37, 0.57, and 0.93 mg/kg) and
15 observed a higher frequency of osteoclasts in the groups that received nicotine;
16 the authors did not present quantification of the histological data, only qualitative
17 results. The method of measuring bone resorption may have influenced the
18 results. In our study, the mean osteoclasts per square micrometer were measured
19 to avoid the risk of bias relative to the choice of the compression side in the
20 periodontal ligament and alveolar bone. The mean of all ligaments becomes a
21 more reliable model to avoid a false-positive or false-negative result. Thus, in the
22 present study, the variables including bone resorption were convergent in their
23 results, which increased the strength of the evidence.

24 To our knowledge, no scientific work in the literature has evaluated the
25 effect of ethanol and nicotine on the variation of tooth movement. There are only
26 isolated reports of the influence of these substances. Sodagar et al.¹¹ evaluated
27 the effects of three doses of nicotine (0.5, 0.75, or 1 mg/kg) on tooth movement in
28 rats using a force of 60 g/f. Bakathir et al.¹² also used three different doses of
29 nicotine associated with orthodontic movement (30 g/f) and concluded that after
30 14 days of movement, the nicotine accelerated the rats' tooth movement and the
31 effect was dose-dependent. However, there were differences in the
32 methodological designs of those studies when compared to this study, such as
33 the methods of measurement and the time of administration of nicotine prior to
34 orthodontic movement. Regarding the measurement method, Bakathir et al.¹²

1 used a digital caliper and Sodagar et al.¹¹ used an interproximal thickness gauge.
2 In the present study, we opted to make molds and gypsum models before and
3 after the movement period to provide a more reliable result. Our method ensured
4 that the soft tissues of the animal's mouth did not interfere with the measurement.

5 Another difference between the studies was the time of application of
6 nicotine prior to orthodontic movement. Sodagar et al.¹¹ and Bakathir et al.¹² used
7 a 14-day application period; we opted for a longer application period to intensify
8 the effect of the nicotine in the animal. Ghanem et al.³¹ reported that
9 administration of nicotine for 6 weeks or more is the ideal period for the effects on
10 bone metabolism to be evident in animals, yet in every study, the period of
11 previous application combined with the period of movement did not exceed 4
12 weeks. There is no report in the literature evaluating the effects of ethanol on the
13 variation of tooth movement. There is only one study in the literature,⁸ which
14 evaluated the histological aspects. Our results suggested that nicotine and
15 ethanol did not affect the variation of tooth movement.

16 In the present study, there was no difference in group $\times$ time interaction for
17 body weight. The orthodontic device installed in the oral cavity of the animals can
18 generate discomfort for the animal and difficulty eating, with a consequent change
19 in weight.³² In addition, co-administration of ethanol and nicotine may also lead to
20 lower body weight gain. This was verified by Soares et al.¹⁹ when they observed
21 that the group that received nicotine and ethanol was the group that gained the
22 least weight. Frankham et al.³³ reported that human satiety is accelerated by
23 nicotine. This may occur through the direct influence of nicotine, especially in the
24 dopaminergic system or by the release of leptin. However, although reports
25 indicate that nicotine and ethanol may influence the weight variation of the animal,
26 these factors were not sufficient to interfere in the weight of the animals in our
27 study.

28 In many parts of the world, alcohol and tobacco are considered legal drugs
29 and are widely consumed. Therefore, it is of extreme importance that
30 orthodontists know the influence of these drugs on orthodontic movement as,
31 based on our findings, these substances can interfere with bone metabolism
32 through decreased bone neoformation when dental movement is induced, and an
33 decreased number of osteoclasts when not induced. Extrapolating to a clinical
34 situation, the delay in maturation or the increased degradation of type I collagen

may indicate to the orthodontist the need for a longer interval between visits for these patients. However, although rats are a well-established model for evaluation of these substances on bone metabolism, animal studies provide only preliminary evidence, which is a limitation of their usage and also a future recommendation for performance of studies in humans to strengthen the evidence of the results already found.

CONCLUSION

Nicotine and ethanol did not affect rate of tooth movement or body weight, regardless of the induction of orthodontic movement. Nicotine influenced the number of osteoclasts by decreasing their quantity when dental movement was not induced. When nicotine was associated with ethanol, it interfered in the maturation of collagen fibers during orthodontic movement.

REFERENCES

1. Ford MM, McCracken AD, Davis NL, Ryabinin AE, Grant KA. Discrimination of ethanol-nicotine drug mixtures in mice: dual interactive mechanisms of overshadowing and potentiation. *Psychopharmacology (Berl)* 2012;224:537-548.
2. Xu H, Wang F, Kranzler HR, Gelernter J, Zhang H. Alcohol and nicotine codependence-associated DNA methylation changes in promoter regions of addiction-related genes. *Sci Rep* 2017;7:41816.
3. Jamal A, King BA, Neff LJ, Whitmill J, Babb SD, Graffunder CM. Current Cigarette Smoking Among Adults - United States, 2005-2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016;65:1205-1211.
4. Nogueira-Filho GR, Froes Neto EB, Casati MZ, Reis SR, Tunes RS, Tunes UR et al. Nicotine effects on alveolar bone changes induced by occlusal trauma: a histometric study in rats. *J Periodontol* 2004;75:348-352.
5. Kirschneck C, Proff P, Maurer M, Reicheneder C, Romer P. Orthodontic forces add to nicotine-induced loss of periodontal bone : An in vivo and in vitro study. *J Orofac Orthop* 2015;76:195-212.
6. Sloan A, Hussain I, Maqsood M, Eremin O, El-Sheemy M. The effects of smoking on fracture healing. *Surgeon* 2010;8:111-116.
7. Kallala R, Barrow J, Graham SM, Kanakaris N, Giannoudis PV. The in vitro and in vivo effects of nicotine on bone, bone cells and fracture repair. *Expert Opin Drug Saf* 2013;12:209-233.
8. de Araujo CM, Johann AC, Camargo ES, Tanaka OM. The effects of binge-pattern alcohol consumption on orthodontic tooth movement. *Dental Press J Orthod* 2014;19:93-98.
9. Mikosch P. Alcohol and bone. *Wien Med Wochenschr* 2014;164:15-24.
10. Wipfli H, Samet JM. Global economic and health benefits of tobacco control: part 1. *Clin Pharmacol Ther* 2009;86:263-271.
11. Sodagar A, Donyavi Z, Arab S, Kharrazifard MJ. Effect of nicotine on orthodontic tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2011;139:e261-265.
12. Bakathir MA, Linjawi AI, Omar SS, Aboqura AB, Hassan AH. Effects of nicotine on bone during orthodontic tooth movement in male rats. Histological and immunohistochemical study. *Saudi Med J* 2016;37:1127-1135.
13. Shintcovsk RL, Knop L, Tanaka OM, Maruo H. Nicotine effect on bone remodeling during orthodontic tooth movement: histological study in rats. *Dental Press J Orthod* 2014;19:96-107.
14. Windle M. Alcohol use among adolescents and young adults. *Alcohol Res Health* 2003;27:79-85.
15. Lauing K, Himes R, Rachwalski M, Strotman P, Callaci JJ. Binge alcohol treatment of adolescent rats followed by alcohol abstinence is associated with site-specific differences in bone loss and incomplete recovery of bone mass and strength. *Alcohol* 2008;42:649-656.
16. Rolland B, Naassila M. Binge Drinking: Current Diagnostic and Therapeutic Issues. *CNS Drugs* 2017;31:181-186.
17. Barcia JM, Portoles S, Portoles L, Urdaneta AC, Ausina V, Perez-Pastor GM et al. Does Oxidative Stress Induced by Alcohol Consumption Affect Orthodontic Treatment Outcome? *Front Physiol* 2017;8:22.

- 1 18. Pereira Vasconcelos DF, Dias da Silva MA, Rocha Marques M, Gibilini C,
2 Cardoso Guimaraes Vasconcelos AC, Pereira Barros S. Effects of simultaneous
3 nicotine and alcohol use in periodontitis progression in rats: A histomorphometric
4 study. *J Clin Exp Dent* 2013;5:e95-99.
- 5 19. Soares EV, Favaro WJ, Cagnon VH, Bertran CA, Camilli JA. Effects of alcohol
6 and nicotine on the mechanical resistance of bone and bone neoformation around
7 hydroxyapatite implants. *J Bone Miner Metab* 2010;28:101-107.
- 8 20. Gubner NR, Phillips TJ. Effects of nicotine on ethanol-induced locomotor
9 sensitization: A model of neuroadaptation. *Behav Brain Res* 2015;288:26-32.
- 10 21. Canadian Council on Animal Care. Guide to the Care and Use of
11 Experimental Animals 1997;1:2.
- 12 22. Callaci JJ, Juknelis D, Patwardhan A, Sartori M, Frost N, Wezeman FH. The
13 effects of binge alcohol exposure on bone resorption and biomechanical and
14 structural properties are offset by concurrent bisphosphonate treatment. *Alcohol*
15 *Clin Exp Res* 2004;28:182-191.
- 16 23. Lieber CS. Alcohol and the liver: metabolism of alcohol and its role in hepatic
17 and extrahepatic diseases. *Mt Sinai J Med* 2000;67:84-94.
- 18 24. Nociti FH, Jr., Nogueira-Filho GR, Tramontina VA, Machado MA, Barros SP,
19 Sallum EA et al. Histometric evaluation of the effect of nicotine administration on
20 periodontal breakdown: an in vivo study. *J Periodontal Res* 2001;36:361-366.
- 21 25. Favaro WJ, Cagnon VH. Morphometric and morphological features of the
22 ventral prostate in rats submitted to chronic nicotine and alcohol treatment. *Tissue*
23 *Cell* 2006;38:311-323.
- 24 26. Franzon Frigotto GC, Miranda de Araujo C, Guariza Filho O, Tanaka OM,
25 Batista Rodrigues Johann AC, Camargo ES. Effect of fluoxetine on induced
26 tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2015;148:450-456.
- 27 27. Brunet MD, Araujo CM, Johann AC, Camargo ES, Tanaka OM, Guariza OF.
28 Effects of Zoledronic Acid on Orthodontic Tooth Movement in Rats. *Braz Dent J*
29 2016;27:515-523.
- 30 28. Borges MA, Matos IC, Dias KR. Influence of two self-etching primer systems
31 on enamel adhesion. *Braz Dent J* 2007;18:113-118.
- 32 29. Rudolph DJ, Willes PMG, Sameshima GT. A finite element model of apical
33 force distribution from orthodontic tooth movement. *Angle Orthod* 2001;71:127-
34 131.
- 35 30. Eriksen EF, Charles P, Melsen F, Mosekilde L, Risteli L, Risteli J. Serum
36 markers of type I collagen formation and degradation in metabolic bone disease:
37 correlation with bone histomorphometry. *J Bone Miner Res* 1993;8:127-132.
- 38 31. Ghanem A, Abduljabbar T, Akram Z, Vohra F, Kellesarian SV, Javed F. A
39 systematic review and meta-analysis of pre-clinical studies assessing the effect of
40 nicotine on osseointegration. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2017.
- 41 32. King GJ, Keeling SD, McCoy EA, Ward TH. Measuring dental drift and
42 orthodontic tooth movement in response to various initial forces in adult rats. *Am J*
43 *Orthod Dentofacial Orthop* 1991;99:456-465.
- 44 33. Frankham P, Cabanac M. Nicotine lowers the body-weight set-point in male
45 rats. *Appetite* 2003;41:1-5.

1 **ANEXOS**
2
3 **Anexo I – Parecer de aprovação do CEUA #778 e #779**



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Núcleo de Bioética
Comitê de Ética no Uso de Animais

Curitiba, 23 de maio de 2013

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 778 – 2ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Efeito da nicotina na movimentação dentária em ratos wistar

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Adriana Cristina Rocha

EQUIPE DE PESQUISA:

Adriana Cristina Rocha, Elisa Souza Camargo

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO:

Escola da Saúde e Biociências / Odontologia

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
Ratos Wistar	Macho	9 semanas / 300-350g	B	144

O colegado do CEUA em reunião no dia 23/05/2013, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas

Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório ao CEUA-PUCPR descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.



4
5
6
7
8
9
10

1
2
3

Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.


Atenciosamente,

Prof.ª Marta Luciane Fischer
Coordenadora
Comitê de Ética no Uso de Animais



4
5



Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Núcleo de Bioética
Comitê de Ética no Uso de Animais

Curitiba, 23 de maio de 2013.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 779 – 2ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Efeito da nicotina e etanol na movimentação dentária em ratos wistar

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Adriana Cristina Rocha

EQUIPE DE PESQUISA:

Adriana Cristina Rocha, Elisa Souza Camargo

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO:

Escola da Saúde e Biociências / Odontologia

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
Ratos Wistar	Macho	9 semanas / 300-350g	B	144

O colegiado do CEUA em reunião no dia 23/05/2013, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório ao CEUA-PUCPR descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.



Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.


Atenciosamente,

Prof.ª Marta Luciane Fischer
Coordenadora
Comitê de Ética no Uso de Animais



Anexo II - Normas para publicação American Journal of Orthodontics

Guidelines for Original Articles

Submit Original Articles via EES: <http://ees.elsevier.com/ajodo>. Before you begin, please review the guidelines below. To view a 7-minute video explaining how to prepare your article for submission, go to [Video on Manuscript Preparation](#).

1. *Title Page*. Put all information pertaining to the authors in a separate document. Include the title of the article, full name(s) of the author(s), academic degrees, and institutional affiliations and positions; identify the corresponding author and include an address, telephone and fax numbers, and an e-mail address. This information will not be available to the reviewers.

2. *Abstract*. Structured abstracts of 200 words or less are preferred. A structured abstract contains the following sections: Introduction, describing the problem; Methods, describing how the study was performed; Results, describing the primary results; and Conclusions, reporting what the authors conclude from the findings and any clinical implications.

3. *Manuscript*. The manuscript proper should be organized in the following sections: Introduction and literature review, Material and Methods, Results, Discussion, Conclusions, References, and figure captions. Express measurements in metric units, whenever practical. Refer to teeth by their full name or their FDI tooth number. For style questions, refer to the *AMA Manual of Style, 10th edition*. Cite references selectively, and number them in the order cited. Make sure that all references have been mentioned in the text. Follow the format for references in "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (Ann Intern Med 1997;126:36-47); <http://www.icmje.org>. Include the list of references with the manuscript proper. Submit figures and tables separately (see below); do not embed figures in the word processing document.

1 4. *Figures*. Digital images should be in TIF or EPS format, CMYK or grayscale, at
2 least 5 inches wide and at least 300 pixels per inch (118 pixels per cm). Do not
3 embed images in a word processing program. If published, images could be
4 reduced to 1 column width (about 3 inches), so authors should ensure that figures
5 will remain legible at that scale. For best results, avoid screening, shading, and
6 colored backgrounds; use the simplest patterns available to indicate differences in
7 charts. If a figure has been previously published, the legend (included in the
8 manuscript proper) must give full credit to the original source, and written
9 permission from the original publisher must be included. Be sure you have
10 mentioned each figure, in order, in the text.

11
12 5. *Tables*. Tables should be self-explanatory and should supplement, not
13 duplicate, the text. Number them with Roman numerals, in the order they are
14 mentioned in the text. Provide a brief title for each. If a table has been previously
15 published, include a footnote in the table giving full credit to the original source
16 and include written permission for its use from the copyright holder. Submit tables
17 as text-based files (Word is preferred, Excel is accepted) and not as graphic
18 elements. Do not use colors, shading, boldface, or italic in tables. Do not submit
19 tables as parts A and B; divide into 2 separate tables. Do not "protect" tables by
20 making them "read-only." The table title should be put above the table and not as
21 a cell in the table. Similarly, table footnotes should be under the table, not table
22 cells.

23
24 6. *Model release and permission forms*. Photographs of identifiable persons must
25 be accompanied by a release signed by the person or both living parents or the
26 guardian of minors. Illustrations or tables that have appeared in copyrighted
27 material must be accompanied by written permission for their use from the
28 copyright owner and original author, and the legend must properly credit the
29 source. Permission also must be obtained to use modified tables or figures.

30
31 7. *Copyright release*. In accordance with the Copyright Act of 1976, which became
32 effective February 1, 1978, all manuscripts must be accompanied by the following
33 written statement, signed by all authors: "*The undersigned author(s) transfers all*
34 *copyright ownership of the manuscript [insert title of article here] to the American*

1 Association of Orthodontists in the event the work is published. The undersigned
2 author(s) warrants that the article is original, does not infringe upon any copyright
3 or other proprietary right of any third party, is not under consideration by another
4 journal, has not been previously published, and includes any product that may
5 derive from the published journal, whether print or electronic media. I (we) sign for
6 and accept responsibility for releasing this material." Scan the printed copyright
7 release and submit it via EES.

8
9 8. Use the International Committee of Medical Journal Editors Form for the
10 Disclosure of Conflict of Interest (ICMJE Conflict of Interest Form). If the
11 manuscript is accepted, the disclosed information will be published with the
12 article. The usual and customary listing of sources of support and institutional
13 affiliations on the title page is proper and does not imply a conflict of interest.
14 Guest editorials, Letters, and Review articles may be rejected if a conflict of
15 interest exists.

16
17 9. Institutional Review Board approval. For those articles that report on the results
18 of experiments of treatments where patients or animals have been used as the
19 sample, Institutional Review Board (IRB) approval is mandatory. No experimental
20 studies will be sent out for review without an IRB approval accompanying the
21 manuscript submission.