



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

**ESCOLA DE SAÚDE E BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO ORTODONTIA**

ADRIANA CRISTINA ROCHA

**EFEITO DA NICOTINA E DO ETANOL NA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA
DURANTE O MOVIMENTO ORTODÔNTICO EM RATOS**

Curitiba

2015

ADRIANA CRISTINA ROCHA

**EFEITO DA NICOTINA E DO ETANOL NA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA
DURANTE O MOVIMENTO ORTODÔNTICO EM RATOS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Souza Camargo.

**Curitiba
2015**

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

R672e
2015

Rocha, Adriana Cristina

Efeito da nicotina e do etanol na neoformação óssea durante o movimento
ortodôntico em ratos / Adriana Cristina Rocha; orientadora, Elisa Souza
Camargo. -- 2015
64 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2015.
Inclui bibliografias

1. Odontologia. 2. Ortodontia. 3. Movimentação dentária. 4. Nicotina - Efeito
fisiológico. 5. Álcool – Efeito fisiológico 6. Osseointegração . I. Camargo,
Elisa Souza. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDD 20. ed. – 617.6

TERMO DE APROVAÇÃO

ADRIANA CRISTINA ROCHA

EFEITO DA NICOTINA E DO ETANOL NA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA DURANTE O MOVIMENTO ORTODÔNTICO EM RATOS

Dissertação 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 **Mestre em Odontologia**, Área de Concentração em **Ortodontia**.

Orientador(a):



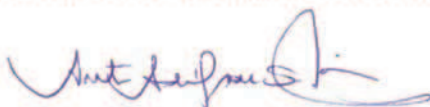
Prof.ª Dr.ª Elisa Souza Camargo

Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR



Prof. Dr. Odilon Guariza Filho

Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR



Prof. Dr. Antonio Adilson Soares de Lima

Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFPR

Curitiba, 08 de julho de 2015.

O amor é sofredor, é benigno;
o amor não é invejoso;
o amor não trata com leviandade,
não se ensoberbece.
Não se porta com indecência,
não busca os seus interesses,
não se irrita, não suspeita mal;
Não folga com a injustiça,
mas folga com a verdade;

Tudo sofre,
tudo crê,
tudo espera,
tudo suporta
O amor nunca falha;
mas havendo profecias, serão aniquiladas;
havendo línguas, cessarão;
havendo ciência, desaparecerá;

Porque, em parte, conhecemos,
e em parte profetizamos;

Mas, quando vier o que é perfeito,
então o que o é em parte será aniquilado.

Quando eu era menino,
falava como menino,
sentia como menino,
discorria como menino,
mas, logo que cheguei a ser homem,
acabei com as coisas de menino.

Porque agora vemos por espelho em enigma,
mas então veremos face a face;
agora conheço em parte,
mas então conhecerei como também sou conhecido.

Agora, pois, permanecem a fé,
a esperança e o amor,
estes três,
mas o maior destes é o amor.

SUMÁRIO

ARTIGO EM PORTUGUÊS	1
Página título	2
Resumo.....	3
Introdução	4
Material e Métodos.....	5
Resultados	8
Discussão	16
Conclusões.....	20
Referências	21
ARTIGO EM INGLÊS.....	25
Title page.....	26
Abstract	27
Introduction	28
Material and Methods.....	29
Results	32
Discussion	40
Conclusions	43
References.....	44
ANEXOS	48
Parecer de comitê de ética.....	49
Metodologia complementar	51
Normas para publicação	59

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13

1. ARTIGO EM PORTUGUÊS

1 PÁGINA TÍTULO

2
3 **EFEITO DA NICOTINA E DO ETANOL NA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA DURANTE O**
4 **MOVIMENTO ORTODÔNTICO EM RATOS**

5
6 **Adriana Cristina Rocha, CD**

7 Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil

8 Escola de Saúde e Biociências

9 Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Ortodontia

10 Email: adricristina.rocha@gmail.com

11
12 **Aline Cristina Batista Rodrigues Johann, CD, PhD**

13 Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil.

14 Escola de Saúde e Biociências

15 Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Estomatologia

16 Email: aline.johann@pucpr.br

17
18 **Elisa Souza Camargo, CD, PhD**

19 Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil

20 Escola de Saúde e Biociências

21 Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Ortodontia

22 Email: escamargo@uol.com.br

23
24 Autor correspondente

25 **Profa. Dra. Elisa Souza Camargo, CD, PhD**

26 Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Escola de Saúde e Biociências

27 Programa de Pós-graduação em Odontologia, Ortodontia

28 Rua Imaculada Conceição, 1155, Bairro Prado Velho

29 CEP: 80215-901 – Curitiba, Paraná, Brasil

30 Fone: (55) 41 32711637/ Fax (55) 41 32711405

31 E-mail: escamargo@uol.com.br

RESUMO

Introdução: O objetivo dessa pesquisa foi avaliar a ação da nicotina 1mg/Kg e do etanol 20% sobre o metabolismo, a neoformação óssea e o deslocamento dentário durante o movimento ortodôntico em ratos. **Métodos:** Duzentos ratos *Wistar* machos foram divididos em 4 grupos controle - GC, sem movimentação dentária (GCI- Solução salina, GCII- Nicotina, GCIII- Etanol, GCIV- Nicotina e Etanol) e 4 grupos experimentais - GE, com movimentação dentária (GEI- Solução salina, GEII- Nicotina, GEIII- Etanol e GEIV- Nicotina e Etanol). Após 30 dias de administração das soluções, dispositivo ortodôntico foi instalado nos grupos experimentais aplicando força (25cN) para mesializar os 1^{os} molares maxilares. Os ratos foram eutanasiados 32, 44 e 58 dias após o início do experimento. O colágeno foi avaliado por picrossírius e a taxa de deslocamento dentário mensurada em modelos de gesso. Os dados foram submetidos a análise estatística. **Resultados:** No 28° dia GE IV apresentou menor porcentagem de colágeno tipo I (15,72%) quando comparado a GE I ($p<0,05$) e GE III e GE IV menor porcentagem de colágeno tipo I quando comparado a GC III (18,45%) e GC IV (21,03%), respectivamente ($p<0,05$). No 28° dia, GE II apresentou menor taxa de deslocamento dentário (32,53%) quando comparado a GE I ($p<0,05$). **Conclusões:** A ação da nicotina favoreceu a diminuição da massa corporal dos animais. A nicotina e o etanol associados atrasaram a neoformação óssea, diminuindo a porcentagem de fibras colágenas maduras. A nicotina diminuiu o deslocamento dentário.

1 INTRODUÇÃO

2
3 A nicotina (*Nicotiana tabacum*) é o componente químico mais ativo presente
4 no tabaco. Ela afeta, direta ou indiretamente, o metabolismo celular, e age
5 negativamente na homeostase do sistema cardiovascular, nervoso autônomo,
6 endócrino e ósseo.^{1,2,3} Como principal componente do cigarro, ela exerce efeito
7 negativo sobre o tecido ósseo e pode causar vasoconstrição, estimular a trombose e
8 isquemia tecidual, aumentar a perda de osso peri-implantar e reduzir a atividade das
9 células osteogênicas.¹ O tabagismo influencia de forma negativa o tratamento
10 ortodôntico, já que interfere nos processos de remodelação óssea, essenciais para
11 que ocorra a movimentação dentária.^{4,5} Contudo, Gao et al,⁶ relatam que o
12 mecanismo pelo qual o cigarro exerce efeito negativo sobre o osso ainda não é bem
13 compreendido.⁶

14 O etanol pode alterar o processo de remodelação óssea direta e
15 indiretamente; seu consumo excessivo compromete o processo de neoformação
16 óssea, inibindo a atividade dos osteoblastos.⁷ De forma indireta, o excesso de álcool
17 pode provocar alterações bioquímicas no tecido ósseo como a diminuição da síntese
18 de DNA e aceleração da apoptose osteoblástica.⁵ O etanol atua também sobre a
19 modulação de hormônios reguladores do metabolismo (metabólitos da vitamina D,
20 hormônios das paratireóides e calcitonina) podendo gerar doenças hepáticas e
21 deficiências nutricionais.⁸ O efeito do álcool sobre o tecido ósseo parece ser
22 influenciado, tempo de consumo, nível de consumo e gênero. Há evidências da
23 ocorrência de desequilíbrio no remodelamento ósseo, com predomínio da
24 reabsorção óssea em adultos jovens, devido à maior exposição ao álcool.^{9,10}

25 A movimentação ortodôntica é baseada no complexo processo de
26 remodelação óssea, no qual uma força biomecânica aplicada a um dente, promove
27 reações celulares sobre os tecidos adjacentes desencadeando uma inflamação
28 asséptica de destruição e neoformação óssea local.^{11,12} Soares et al³ concluíram que
29 o consumo de etanol ou nicotina separadamente podem trazer efeitos negativos ao
30 osso, reduzindo a neoformação óssea ao redor de implantes. Porém, quando etanol
31 e nicotina foram administrados simultaneamente, o efeito negativo sobre o osso foi
32 intensificado.³

1 Tendo conhecimento de que considerável parcela da população ingere álcool
2 e possui o vício de fumar,¹³ e que ambos podem afetar o metabolismo ósseo, se faz
3 importante avaliar o movimento dentário induzido, sob o efeito da nicotina e do
4 etanol, assim como da associação destas substâncias.

5 Uma vez que não foram encontrados na literatura artigos a esse respeito, o
6 objetivo deste trabalho foi avaliar a neoformação óssea e o deslocamento dentário
7 durante o movimento ortodôntico em ratos assim como variações na massa corporal
8 dos animais, sob a ação de Nicotina (1mg/kg) diariamente, e de Etanol a 20% no
9 padrão Binge.

12 MATERIAL E MÉTODOS

14 O presente trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética para Uso
15 de Animais em Pesquisa da PUCPR (#779).

17 Amostra

18 A amostra foi constituída por 200 ratos machos da linhagem *Wistar (Rattus*
19 *norvegicus albinus)* com aproximadamente 9 semanas de vida, pesando entre 300 –
20 350g. Os animais foram fornecidos e mantidos pelo Biotério da PUCPR, no qual
21 todos os cuidados em relação à higiene, iluminação, ventilação e alimentação dos
22 ratos foram respeitados seguindo as recomendações e orientações éticas do
23 Canadian Council on Animal Care.¹⁴

24 A dieta dos animais era a base de água e ração *ad libitum* durante todo
25 experimento. Antes da instalação dos dispositivos para movimentação dentária a
26 ração era fornecida sólida. Após a instalação dos dispositivos a ração passou a ser
27 fornecida triturada no intuito de prevenir eventuais danos à aparelhagem ortodôntica
28 e facilitar a alimentação dos animais.

29 Os ratos foram divididos aleatoriamente em oito grupos (Tabela I, pág. 6). A
30 administração das soluções foi realizada durante todo o período experimental, a
31 todos os grupos. Os animais dos grupos controle foram eutanasiados 32, 44 e 58
32 dias após início do experimento, conforme subgrupo a que pertenciam. Estes
33 períodos determinados correspondem ao que seria a fase inicial, intermediária e final

do movimento dentário após a aplicação de uma força ortodôntica. Nos animais do grupo experimental, o movimento ortodôntico foi iniciado no 30º dia e a eutanásia foi realizada também 32, 44 e 58 dias após o início do experimento, ou seja, após 2, 14 e 28 dias de movimento dentário. Todos os animais foram eutanasiados por overdose de solução anestésica (Ketamina 270mg/Kg / Xilazina- 30g/Kg), via intraperitoneal.

A administração do etanol e da solução salina ocorreu por via intraperitoneal, mimetizando o padrão Binge de consumo de etanol, administrado por quatro dias subseqüentes, seguidos por três dias de abstinência.⁸ A nicotina (Nicotine hemisulphate, Sigma-Aldrich Chemicals Pvt Ltd St. Louis, MO, EUA) foi previamente preparada, diluída em solução salina 0,9% e homogeneizada. Foi administrada por via subcutânea no dorso dos animais, todos os dias sem intervalo, até o dia da eutanásia.³

Todos os animais foram pesados semanalmente, com o auxílio de balança eletrônica de precisão (Gehaka – BG 4001, São Paulo, Brasil) a fim de ajustar a dose da substância administrada. A variação da massa corporal foi calculada pela fórmula: Variação da massa corporal=Massa inicial-Massa final.

Tabela I. Descrição dos grupos e subgrupos de acordo com a solução utilizada

CONTROLE				EXPERIMENTAL			
GC I n=15	GCII n=21	GC III n=21	GC IV n=21	GE I n=30	GE II n=30	GE III n=30	GE IV n=29
Solução Salina 0,9% (3g/kg/dia)	Nicotina (1mg/kg)	Etanol 20% (3g/kg/dia)	Nicotina (1mg/kg) e Etanol 20% (3g/kg/dia)	Solução Salina 0,9% (3g/kg/dia)	Nicotina (1mg/kg)	Etanol 20% (3g/kg/dia)	Nicotina (1mg/kg) e Etanol 20% (3g/kg/dia)

Movimento ortodôntico

O movimento dentário foi realizado por dispositivo ortodôntico constituído por uma mola de níquel-titânio que transmitiu força recíproca de 25cN,¹⁵ ao primeiro molar superior direito e incisivos centrais, mensurada por meio de dinamômetro (Haag-Streit AG, Koeniz, Suíça), previamente calibrado. Após a ativação inicial, a

1 mola não foi reativada durante o período experimental. No entanto, seu
2 posicionamento foi conferido diariamente.

5 **Processamento Histotécnico**

6 Após a eutanásia dos animais, as hemimaxilas direitas foram removidas,
7 armazenadas em formaldeído a 10% e enviadas ao Laboratório de Patologia
8 Experimental da PUCPR onde as peças foram processadas.

9 Para cada peça foram obtidas 06 secções transversais a partir do terço
10 cervical da raiz méso-vestibular do primeiro molar superior, cortadas em micrótomo
11 com 4µm de espessura, com a superfície oclusal do molar paralela ao micrótomo e
12 com intervalo de 60 µm entre cada secção.

13 Os cortes corados pela técnica de picrossírius foram avaliados sob microscopia
14 de luz. As imagens foram capturadas por câmera e analisadas no analisador de
15 imagens Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, MD) para obtenção da
16 percentagem da área de colágeno maduro e imaturo no osso alveolar.¹⁶ Foi
17 considerado colágeno do tipo I (colágeno maduro) aquele que apresentasse
18 coloração vermelho-alaranjada, enquanto o colágeno do tipo III (imaturo) coloração
19 verde-amarelada.¹⁶ O osso adjacente ao lado distal da raiz foi escolhido para
20 avaliação, pois durante o movimento ortodôntico o osso é depositado na parede
21 alveolar do lado de tração.¹¹

24 **Taxa de deslocamento dentário**

25 Para a avaliação da taxa de deslocamento dentário, foram realizadas
26 moldagens dos arcos dentários superiores dos ratos no início (antes da instalação
27 dos dispositivos ortodônticos) e no final do experimento (logo após a eutanásia).
28 Para tal, os animais foram anestesiados (pentobarbital sódico – Syntec, Cotia, Brasil)
29 e moldados com silicone de condensação à base de polidimetilsiloxano (Vigodent
30 Coltene, Rio de Janeiro, Brasil). Os modelos foram confeccionados com gesso tipo
31 IV (Durone IV Gesso Pedra, Dentsply, Petrópolis, Brasil).

32 A distância da face palatina do incisivo superior direito até a face mesial do
33 primeiro molar superior direito foi mensurada com auxílio de paquímetro digital

(Absolute-Mitutoyo, Kawasaki-Shi, Japan). O deslocamento dentário foi calculado pela fórmula: Taxa de deslocamento dentário = Distância Inicial - Distância Final.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa SPSS (versão 22.0; IBM SPSS, Armonk, NY). O nível de significância adotado em todos os testes estatísticos foi de 0,05.

Visando identificar se existia diferença estatisticamente significativa nos valores médios das variáveis: porcentagem de colágeno tipo I no osso alveolar, taxa de deslocamento dentário e variação de massa corporal, segundo grupo e tempo, testou-se a normalidade dos dados utilizando o teste de Shapiro Wilk. Na seqüência foi testada a homogeneidade das variâncias entre diferentes tratamentos usando 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 (*Power analysis*).

RESULTADOS

Neoformação óssea

Na avaliação do colágeno tipo I, a comparação de grupos independente de tempo, para os grupos controle não foi verificada diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$), e foi verificada diferença para os grupos experimentais ($p<0,05$).GE III

1 apresentou menor porcentagem de colágeno quando comparado a GE I (10,58%) e
2 a GE II (11,53%) (Tabela II, pág. 10) (Poder do teste >90%).

3 Na relação grupo x tempo, ao comparar os grupos controle entre si, não foi
4 verificada diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) (Tabela III, pág. 10). Na
5 comparação dos grupos experimentais entre si, foi observada diferença
6 estatisticamente significativa no 28º dia, tendo o GE IV apresentado menor
7 porcentagem de colágeno (15,72%) do que o GE I ($p<0,05$) (Tabela IV, pág. 11)
8 (Poder do teste >90%).

9 Na comparação entre os grupos controle e os experimentais segundo grupo x
10 tempo foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) (Tabela V,
11 pág.11). No 28º dia, GE III apresentou menor porcentagem de colágeno (18,45%)
12 quando comparado a GC III, e GE IV, menor porcentagem de colágeno (21,03%)
13 quando comparado a GC IV ($p<0,05$) (Poder do teste >90%)

Tabela II. Comparações da variável porcentagem de colágeno tipo I (%) entre grupos independente de tempo (Grupo Experimental)

Média ± DP		Comparações								Poder do teste
		GE I x GE II	GE I x GE III	GE I x GE IV	GE I x GE II	GE I x GE III	GE I x GE IV	GE II x GE III	GE II x GE IV	
88,72 ±8,99	89,67 ±6,91	79,33 ±11,98	87,62 ±10,24		0,9998	0,0241	0,9998	0,0039	0,9846	0,1017
*Nível de significância do teste Games-Howell: $p < 0,05$.										
1,0000										

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

Grupos/ Tempo	Média ± DP				Comparações								Poder do teste
	GC I	GC II	GC III	GC IV	GC I x GC II	GC I x GC III	GC I x GC IV	GC II x GC III	GC II x GC IV	GC III x GC IV			
2 Dias	97,45 ± 0,99	97,79 ± 0,34	92,89 ± 1,21	95,29 ± 1,08	1,0000	0,4589	0,9917	0,1918	0,7963	0,9915	1,0000		
14 Dias	93,45 ± 1,79	90,01 ± 1,77	94,44 ± 0,70	95,85 ± 0,43	0,9940	1,0000	0,9867	0,7490	0,9883	0,9632			
28 Dias	96,35 ± 1,18	93,33 ± 2,62	98,41 ± 0,42	97,77 ± 0,47	0,9997	0,9536	0,9985	0,8973	0,9575	0,9999			

*Nível de significância do teste Games-Howell: $p < 0.05$.

Grupo Controle(GC): GC I – Solução Salina, GC II – Nicotina, GC III – Etanol, GC IV – Nicotina e etanol. Grupo Experimental(GE): GE I – Solução salina, GE II – Nicotina, GE III – Etanol e GE IV – Nicotina e etanol.

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

Grupos/ Tempo	Média ± DP				Comparações								Poder do teste
	GE I	GE II	GE III	GE IV	GE I x GE II	GE I x GE III	GE I x GE IV	GE II x GE III	GE II x GE IV	GE III x GE IV			
2 Dias	86,94 ± 2,54	93,95 ± 1,77	73,49 ± 4,32	91,59 ± 2,26	0,7952	0,5631	0,9979	0,0633	1,0000	0,1523	1,0000		
14 Dias	87,61 ± 3,62	89,18 ± 1,84	84,26 ± 2,97	93,02 ± 2,61	1,0000	0,9999	0,9995	0,9962	0,9996	0,8220			
28 Dias	91,60 ± 2,23	85,88 ± 2,27	80,25 ± 3,49	77,20 ± 2,45	0,9626	0,5301	0,0448	0,9977	0,6083	1,0000			

*Nível de significância do teste Games-Howell: $p < 0,05$.

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

Grupos/ Tempo	Média ± DP								Comparações				Poder do teste
	GC I	GC II	GC III	GC IV	GE I	GE II	GE III	GE IV	GC I x GE I	GC II x GE II	GC III x GE III	GC IV x GE IV	
2 Dias	97,45 ± 0,99	97,79 ± 0,34	92,89 ± 1,21	95,29 ± 1,08	86,94 ± 2,54	93,95 ± 1,77	73,49 ± 4,32	91,59 ± 2,26	0,1408	0,8408	0,0811	0,9923	0,998
14 Dias	93,45 ± 1,79	90,01 ± 1,77	94,44 ± 0,70	95,85 ± 0,43	87,61 ± 3,62	89,18 ± 1,84	84,26 ± 2,97	93,02 ± 2,61	0,9935	1,0000	0,2915	0,9998	
28 Dias	96,35 ± 1,18	93,33 ± 2,62	98,41 ± 0,42	97,77 ± 0,47	91,60 ± 2,23	85,88 ± 2,27	80,25 ± 3,49	77,20 ± 2,45	0,9332	0,8433	0,0329	0,0017	

*Nível de significância do teste Games-Howell: $p < 0,05$.

1 Grupo Controle(GC): GC I – Solução Salina, GC II – Nicotina, GC III – Etanol, GC IV – Nicotina e etanol. Grupo Experimental(GE): GE I
2 – Solução salina, GE II – Nicotina, GE III – Etanol e GE IV – Nicotina e etanol.

Tabela VI. Comparações da variação da taxa de deslocamento dentário (mm) na relação Grupo x Tempo (Grupos Experimentais)

Grupo/ Tempo	(Média ± DP)				Comparações								Poder do teste
	GE I	GE II	GE III	GE IV	GE I x GE II	GE I x GE III	GE I x GE IV	GE II x GE III	GE II x GE IV	GE III x GE IV			
2 dias	6833 ± 58452	4538 ± 51416	9571 ± 65792	6933 ± 66490	0,9999	0,9977	1,0000	1,0000	1,0000	0,9910	0,6686		
14 dias	3000 ± 25298	3000 ± 30128	5444 ± 69841	4400 ± 49486	1,0000	0,9986	1,0000	1,0000	0,9983	1,0000			
28 dias	5400 ± 51769	3643 ± 31527	3889 ± 27131	5818 ± 47920	0,0479	1,0000	1,0000	0,303	0,9629	0,9993			

* Nível de significância adotado pelo teste de Tukey: $p < 0,05$.

Tabela VII. Médias e desvios padrão da variação de massa corporal (g) nos grupos Controle (C) e Experimental (E)

Grupos/ Tempos	Média ± DP								Comparações				Poder do teste
	GC I	GC II	GC III	GC IV	GE I	GE II	GE III	GE IV	GC I x GE I	GC II x GE II	GC III x GE III	GC IV x GE IV	
2 Dias	-7,83± 16,77	16,57 ±31,8	9,85 ± 23,95	-5,28 ± 20,02	-3,94± 14,09	17,2± 9,89	11,6 ± 11,52	9,59 ± 17,05	0,1408	0,8408	0,0811	0,9923	0,998
14 Dias	-20,45 ± 8,79	9,42 ± 10,92	-10,5± 10,58	-9,71 ± 8,44	-1,80± 18,80	-0,71 ±15,81	3,50 ± 22,22	7,0 ± 14,75	0,9935	1,0000	0,2915	0,9998	
28 Dias	-12,00 ±14,1	-21,00 ±7,74	-2,62 ± 19,46	-10,57 ±12,5	-0,70 ± 25,5	6,89 ±23,81	20,70 ± 16,9	25,44 ± 12,6	0,9332	0,8433	0,0329	0,0017	

*Nível de significância do teste Games-Howell: $p < 0,05$.

Grupo Controle(GC): GC I – Solução Salina, GC II – Nicotina, GC III – Etanol, GC IV – Nicotina e etanol. Grupo Experimental(GE): GE I – Solução salina, GE II – Nicotina, GE III – Etanol e GE IV – Nicotina e etanol.

Taxa de deslocamento dentário

Na comparação da taxa de deslocamento dentário entre grupos independente de tempo, não foi verificada diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).

Na relação grupo x tempo, os grupos experimentais apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$). No 28º dia GE II apresentou menor taxa de deslocamento dentário (32,53%) em relação a GE I ($p<0,05$) (Tabela VI, pág. 12) (Poder do teste >60%).

Massa corporal

Na comparação dos grupos independente de tempo, observou-se que em todos os grupos controle, exceto no GC II, houve aumento da massa corporal (Figura 1, pág. 14) e em todos os grupos experimentais, exceto em GE I, ocorreu a diminuição da massa corporal dos ratos (Figura 1, pág. 14).

Foi observada diferença estatisticamente significativa na variação de massa corporal dos ratos na relação grupo x tempo ($p<0,05$) (Tabela VII, pág. 12). No 28º dia, GC IV apresentou menor variação de massa corporal quando comparado a GE IV. No mesmo tempo, o grupo GC III apresentou menor variação de massa corporal quando comparado a GE III (Tabela VII, pág. 12) (Poder do teste >90%).

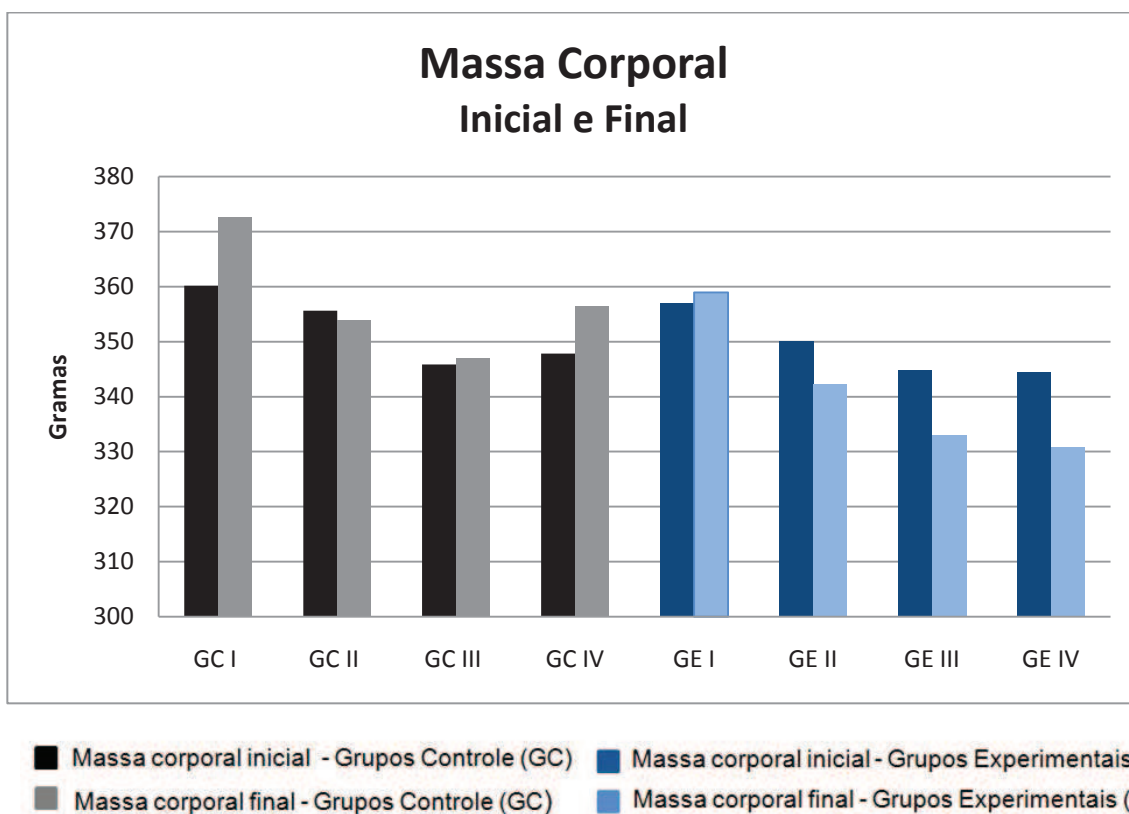


Figura 1. Representação da massa corporal dos grupos controle e experimentais no início e no final do experimento.

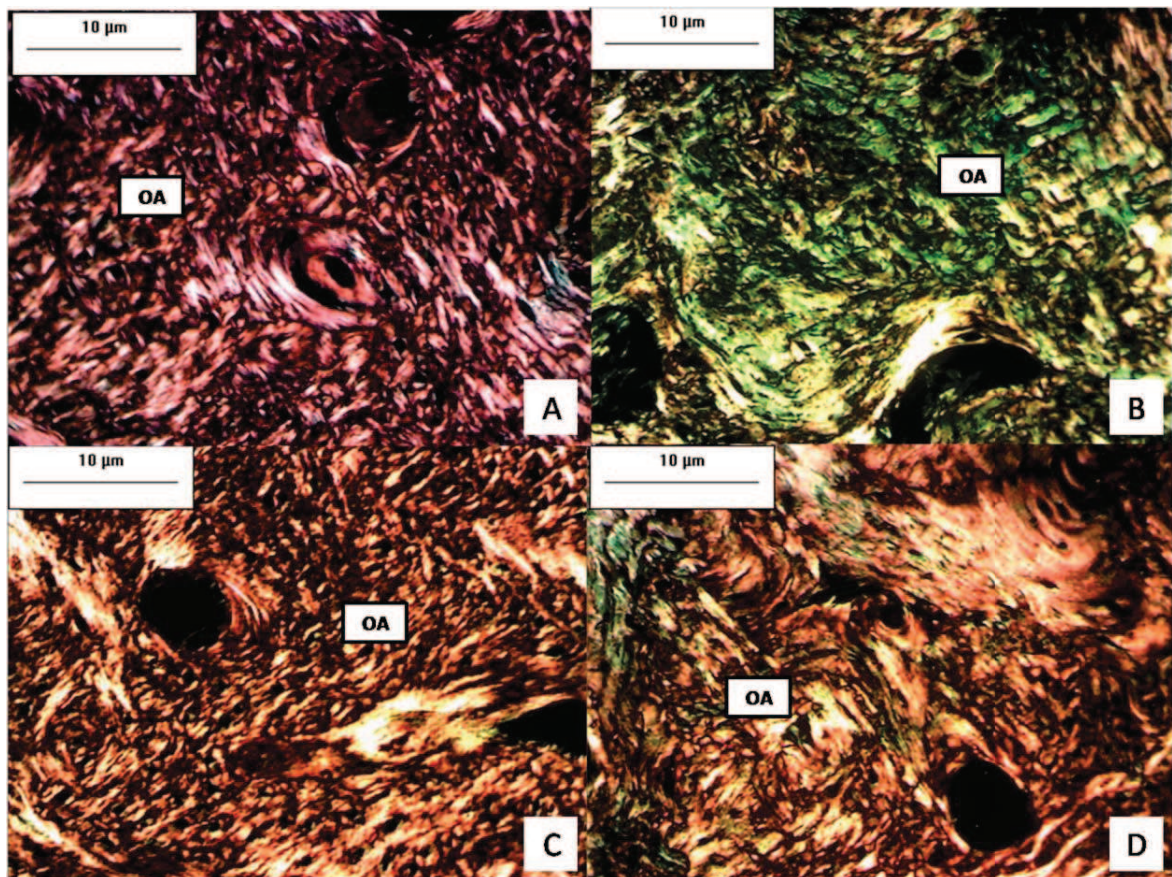


Figura 2. Fotomicrografia de lâmina do lado distal da raiz mésio-vestibular do primeiro molar superior direito. GCIV- Nicotina + Etanol (A) e GCIII- Etanol (C) com predominância de colágeno tipo I; GEIV- Nicotina + Etanol com movimento dentário (B) e GEIII- Etanol com movimento dentário (D), com predominância de colágeno tipo III, no 28^o dia. **OA**, osso alveolar. Picrosírius, magnificação de 200x.

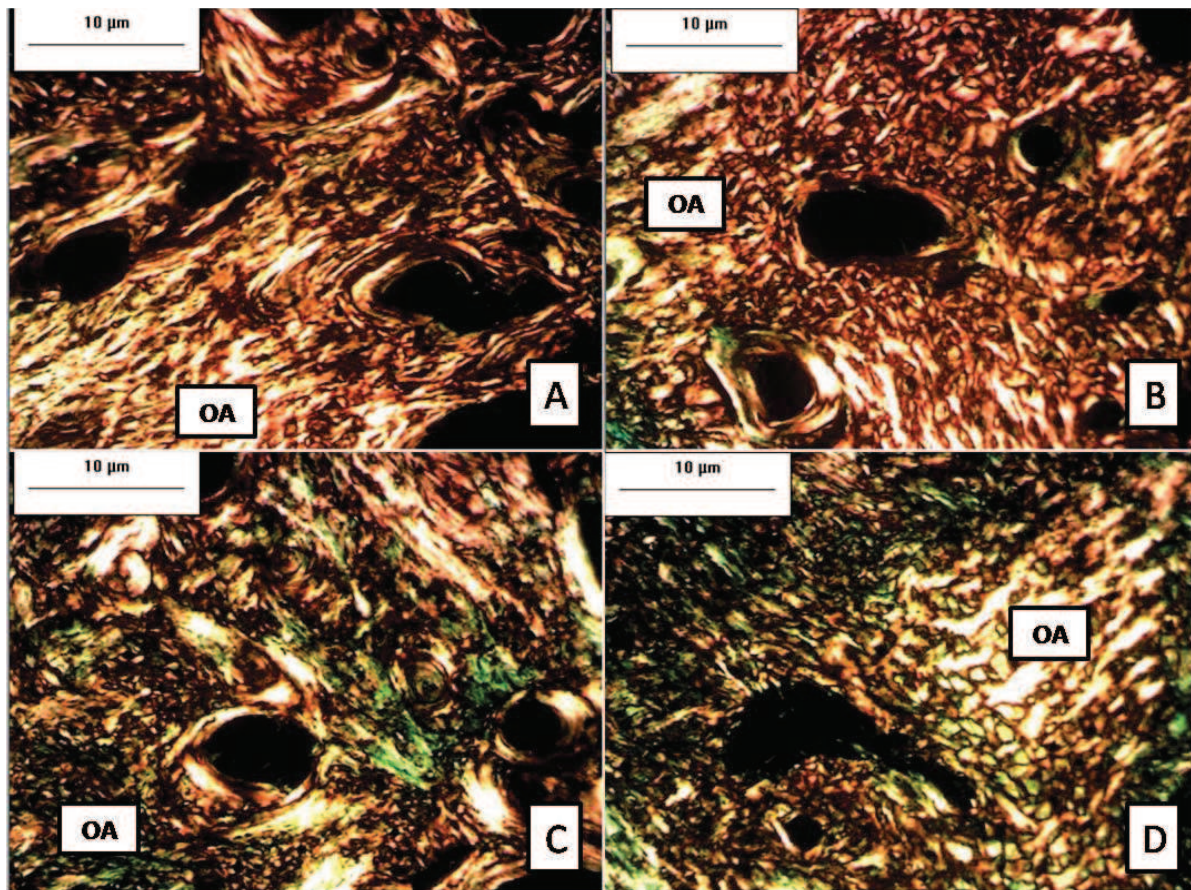


Figura 3. Fotomicrografia de lâmina do lado distal da raiz méso-vestibular do primeiro molar superior direito. GE I- Solução Salina (A), GE II- Nicotina (B), GE III- Etanol (C) e GE IV- Nicotina e Etanol (D), no 28º dia. **OA**, osso alveolar. Picrosírius, magnificação de 200x.

DISCUSSÃO

Em muitas partes do mundo o álcool e o tabaco são considerados como drogas lícitas e são amplamente consumidas pela população.¹⁷ Sabe-se que a combinação dessas duas substâncias pode ter efeitos potencialmente nocivos sobre a matriz óssea^{18,19} e outros tecidos, favorecendo alterações a nível celular, inclusive aumentando as chances de desenvolvimento de neoplasias.²⁰

O padrão Binge de consumo de álcool foi escolhido nesse estudo, por ser o método de consumo crônico tipicamente observado entre adolescentes americanos,²¹ faixa etária esta na qual comumente realizam tratamento

1 ortodôntico.²² O etanol diluído a 20% foi utilizado por 32, 44 e 58 dias, mesma
2 dosagem encontrada em alguns estudos como o de Camilli et al²³ que observaram
3 alterações na osteogênese e que a ação do etanol diminuiu o volume do osso
4 neoformado em ratos. Da mesma forma, Diez et al²⁴ observaram que ratos tratados
5 com álcool 30% por 6 semanas apresentaram redução acentuada no metabolismo
6 mineral e Sampson²⁵ usando a mesma dosagem durante 4 semanas concluiu que
7 vários componentes celulares se apresentaram alterados. Ainda, dosagem menor de
8 etanol (15%) por 5 semanas, inibiu ou atrasou o processo de reparação de fraturas
9 em ratos.²⁶

10 De modo semelhante aos estudos de Soares et al³ e Favaro et al,²⁷ optou-se
11 pelo uso da nicotina 1mg/Kg, por ser essa dosagem compatível com a concentração
12 média de nicotina absorvida em tabagistas que consomem de 15 a 20 cigarros por
13 dia. A administração por via subcutânea foi também empregada em outros
14 estudos^{28,29} e é recomendada pelo fabricante, que afirma que a droga sintética tem
15 potencial altamente tóxico, devendo ser administrada por uma via de absorção lenta.

16 Em nossos resultados a associação de etanol e nicotina influenciou a
17 neoformação óssea (Tabela IV, pág. 11) visto que o grupo que recebeu as duas
18 substâncias e foi submetido à movimentação dentária (GE IV) teve percentual de
19 colágeno tipo I menor comparado aos outros grupos experimentais, sendo
20 estatisticamente significante quando comparado ao grupo que recebeu solução
21 salina (GE I). Nosso resultado mostra-se compatível ao de Vasconcelos et al,¹⁰ que
22 avaliaram o efeito da associação do etanol e nicotina no osso de ratos com doença
23 periodontal induzida, e constataram diminuição do volume ósseo neoformado e
24 alterações na resistência mecânica desse osso.

25 De forma semelhante, Callaci et al³⁰ verificaram aumento na degradação do
26 colágeno tipo I sob o efeito do etanol e Klein e Sampson^{7,25} comprovaram que o
27 etanol pode inibir a proliferação de células osteoblásticas, e diminuir a massa óssea,
28 agindo como elemento tóxico aos órgãos vitais, atuando nocivamente sobre os
29 tecidos mais resistentes do organismo, como o osso. Ao contrário, Maran et al,³²
30 verificaram não haver grande interferência do etanol sobre fibras de colágeno tipo I,
31 porém esse estudo foi realizado em cultura de osteoblastos fetais humanos e o
32 etanol foi administrado por 7 dias.

1 Os animais do grupo controle que receberam somente etanol e os que
2 receberam nicotina e etanol, apresentaram mais colágeno tipo I do que os grupos
3 correspondentes com movimento dentário. Este resultado era esperado, uma vez
4 que a maior parte da matriz orgânica é composta por colágeno tipo I, que através do
5 processo de reabsorção óssea causado pela movimentação dentária é degradado e
6 posteriormente reparado pela deposição de fibras imaturas de colágeno tipo III.^{11,30,32}

7 Em nosso estudo a administração da nicotina, isoladamente, não teve
8 influência direta sobre a neoformação óssea, visto que o colágeno dos animais que
9 receberam esta substância foi semelhante ao dos demais grupos. Esse resultado é
10 contrário ao de Saldanha et al³³ que demonstraram que pequenas doses de nicotina
11 em cães alterou o tecido ósseo neoformado. Da mesma forma, Shintcovsk et al⁵
12 verificaram atraso no processo de maturação do colágeno, porém estes autores
13 usaram nicotina 2 mg/kg, dosagem maior do que a utilizada no presente estudo.

14 Mesmo que em nossos resultados não tenha ocorrido alteração do colágeno
15 nos grupos que receberam isoladamente a nicotina, a taxa de deslocamento
16 dentário no 28º dia foi menor nos ratos que receberam essa solução, (GE II) (Tabela
17 VI, pág. 12), ou seja, a nicotina pareceu atrasar o movimento ortodôntico. Ao
18 contrário de nossos resultados, Shintcovsk et al⁵ e Sodagar et al⁴ observaram que
19 doses diárias de nicotina podem acelerar a movimentação dentária em ratos. As
20 diferentes dosagens, tempo de exposição e via de administração poderiam justificar
21 os resultados conflitantes entre as pesquisas.

22 Segundo Hollinger³⁴, a deposição de nova matriz óssea está relacionada às
23 diferentes concentrações de nicotina administradas. No trabalho deste autor os
24 grupos que não receberam ou receberam doses menores de nicotina apresentaram
25 maior deposição de osso neoformado, enquanto que os que receberam doses
26 maiores, isso não ocorreu. King³⁵ observou em estudo *in vitro*, que a nicotina tem
27 efeito sobre a proliferação e diferenciação dos osteoblastos, o que pode influenciar o
28 metabolismo ósseo.

29 A respeito das alterações ósseas encontradas em animais submetidos ao uso
30 crônico de álcool, existem dúvidas se estas se devem pelo efeito do uso do etanol
31 ou são consequência de possível deficiência nutricional.³⁶ Por isso, consideramos
32 importante o controle da massa corporal dos animais e a adequação das doses das
33 drogas.

Verificamos que os ratos dos grupos GE II, GE III e GE IV apresentaram diminuição de massa corporal ao longo do experimento (Figura 1, pág. 14), possivelmente devido ao fato desses animais terem sido submetidos à movimentação ortodôntica, além da administração das soluções. Além disso, os animais dos grupos experimentais GE III e GE IV que ficaram mais tempo com o dispositivo ortodôntico (28 dias) apresentaram diminuição de massa corporal em relação aos animais dos dois grupos controle correspondentes (GC III e GC IV) (Tabela VII, pág. 12). Segundo King et al³⁵ o dispositivo ortodôntico instalado na cavidade bucal dos animais, pode causar grande desconforto, gerando dificuldade na ingestão de alimentos e conseqüentemente alteração no peso. Entretanto, os ratos dos grupos que receberam somente solução salina, com e sem movimento dentário, tiveram aumento da massa corporal, talvez por não terem sido influenciados pelos efeitos nocivos da nicotina e/ou do etanol³⁷ (Figura 1, pág. 14).

Os grupos que receberam isoladamente administração de nicotina, com e sem movimentação dentária, apresentaram diminuição da massa corporal (Figura 1, pág. 14), corroborando com estudos anteriores^{37,38} que comprovaram que esta substância alcalina age sobre o hipotálamo atuando como inibidor de apetite.

Diferentes metodologias têm sido utilizadas para avaliar os efeitos da nicotina e do álcool sobre o tecido ósseo. No presente estudo observou-se que a associação do etanol com a nicotina afetou a neoformação óssea no período final avaliado, o que poderia atrasar o movimento dentário. Da mesma forma, a nicotina isoladamente diminuiu a quantidade de movimento dentário. Por conseguinte, baseado nesse estudo é possível inferir que quem possui os hábitos de fumar e beber ou somente fumar pode ter prejuízo nos processos relacionados ao movimento ortodôntico. Essa descoberta influencia diretamente no tratamento desse tipo de paciente, comparado ao paciente não alcoolista e não tabagista: as consultas devem ser marcadas em intervalos maiores de tempo, e as forças biomecânicas empregadas devem ser de menor magnitude.

Para melhor comprovar os efeitos destas drogas sobre o metabolismo ósseo e sua influência direta sobre a movimentação dentária, mais estudos devem ser realizados, como maior tempo de exposição das drogas e de movimento ortodôntico.

CONCLUSÕES

A administração de nicotina, etanol, e a associação destas substâncias durante o movimento ortodôntico em ratos *Wistar* permitiu concluir que:

- A nicotina favoreceu a perda de massa corporal dos animais agindo como inibidor de apetite.
- A nicotina e o etanol associados atrasaram a neoformação óssea, diminuindo a porcentagem de fibras colágenas maduras.
- A nicotina diminuiu o deslocamento dentário.

REFERÊNCIAS

1. Zhu BQ, Parmley WW. Hemodynamic and vascular effects of active and passive smoking. *Am Heart J* 1995; 130:1270-75.
2. Theiss SM, Boden SD, Hair G, Titus L, Morone MA, Ugbo J. The effect of nicotine on gene expression during spine fusion. *Spine* 2000; 25:2588-94.
3. Soares EV, Fávaro WJ, Cagnon VH, Bertran CA, Camili JA. Effects of alcohol and nicotine on the mechanical resistance of bone and bone neoformation around hydroxyapatite implants. *J Bone Miner Metab* 2010; 28:101-7.
4. Sodagar A, Donyavi Z, Arab S, Kharrazifard MJ. Effect of nicotine on orthodontic tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2011; 139:261-5.
5. 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.
6. Gao SG, Li KH, Xu M, Jiang W, Shen H, Luo W et al. Bone turnover in passive smoking female rat: relationships to change in bone mineral density. *BMC Musculoskelet Disord* 2011; 12:131.
7. Klein RF. Alcohol-Induced bone disease: impact of ethanol on osteoblast proliferation. *Alcohol* 1997; 21:392-9.
8. Lieber CS. Alcohol and the liver: metabolism of alcohol and its role in hepatic and extrahepatic diseases. *Mt Sinai J Med.* 2000;67:84- 94.
9. Hogan HA, Argueta F, moe I, Nguyen IP, Sampson W. Adult-onset alcohol consumption induces osteopenia in female rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25:746-54.
10. Vasconcelos DFP, Silva MAD, Rocha MM, Gibilini C, Vasconcelos ACG, Barros SP. Effects of simultaneous nicotine and alcohol use in periodontitis progression in rats: a histomorphometric study. *J Clin Exp Dent* 2013; 5:95-9.
11. Wolff J. The law of bone remodeling. Berlin, Germany: Springer-Verlag 1986; 1-22.
12. Hamaya M, Mizoguchi I, Sakakura Y, Yajima T, Abiko Y. Cell death of osteocytes occurs in rat alveolar bone during experimental tooth movement. *Calcif Tissue Int* 2002; 70:117-26.

13. World Health Organization Global Information System on Alcohol and Health (GISAH) (online database). (<http://www.who.int/gho/alcohol>) 2004.
14. Canadian Council on Animal Care. Guide to the Care and Use of Experimental Animals. 1997; 1:2.
15. Ribeiro JS, Maciel JVB, Knop LAH, Machado MN, Grégio AMT, Camargo ES. Effect of Growth Hormone in Experimental Tooth Movement. Braz Dent Journal 2013; 24:5.
16. Borges LF, Gutierrez PS, Marana HR, Taboga SR. Picrosirius-polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapse lesions. Micron 2007; 38:580-3.
17. SESSP- Secretaria de Estado da Saúde de SP – Vigilância epidemiológica. Alcoolismo. (online database). (http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/dic_pr09) 2005.
18. Palmer RM, Wilson RF. Mechanisms of action of environmental factors tobacco smoking. J Clin Periodontol 2005; 6:180-95.
19. Jansson, L. Association between alcohol consumption and dental health. J. Clin Periodontol 2008; 35:379-84.
20. Castellsagué X, Quintana MJ, Martínez MC, Nieto A, Sánchez MJ, Juan A, et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis Intl J Cancer 2004; 108:741-9.
21. Lauing K, Himes R, Rashwaski R, Strotman P, Callaci JJ. Binge alcohol treatment of adolescents rats followed by alcohol abstinence associable with site-specific differences in bone loss and incomplete recovery of bone mass and strength. Alcohol 2008; 42:649-56.
22. Almeida AB, Leite ICG. Orthodontic treatment need for Brazilian schoolchildren: A study using the Dental Aesthetic Index. Dental Press J Orthod 2013; 18:103-9.
23. Camilli JA, Cunha MR, Bertran CA, Kawachi EY. Subperiosteal hydroxyapatite implants in rats submitted to ethanol ingestion. Arch Oral Biol 2004; 44:747-53.
24. Diez A, Serrano S, Cucurull J, Marinoso LL, Bosh J, Prug J, Nogues X, Aubia J. Acute effects of ethanol on mineral metabolism and trabecular bone in Sprague-Dawley rats. Calcifiel Tissue Inter 1997; 61:168-71.
25. Sampson HW. Effects of alcohol consumption on adult and aged bone: a histomorphometric study of the rat animal model. Alcohol Clin Exp Res 2002; 22:2029-34.

- 1 26. Nyquist F, Halvosenv V, Madsen JE, Nordsletten L, Obrant KJ. Ethanol and is
2 effects on fracture healing and bone mass in de male rats. *Acta Orthop Scand* 1999;
3 70:212-6.
- 4 27. Fávaro WJ, Cagnon VH. Morphometric and morphological features of the ventral
5 prostate in rats submitted to chronic nicotine and alcohol treatment. *Tissue Cell* 2006;
6 38:311-23.
- 7 28. Iwaniec UT, Fung YK, Akhter MP, Haven MC, Haynatzki GR, Cullen DM. Effects
8 of nicotine on bone and calciotropic hormones in aged ovariectomized rats. *J*
9 *Musculoskel Neuron Interact* 2002; 2:469-78.
- 10 29. Pinto JR, Bosco AF, Okamoto T, Guerra JB, Piza IG. Effects of nicotine on the
11 healing of extraction sockets in rats. A histological study. *Braz Dent J* 2002; 13:3-9.
- 12 30. 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 Clin*
15 *Exp Res* 2004; 28:182-91
- 16 31. Maran A, Zhang M, Spelsberg TC, Turner RT. The dose-response effects of
17 ethanol on the human fetal osteoblastic cell line. *J Bone Miner Res* 2001; 16:270-6
- 18 32. Eriksen EF, Charles P, Melsen F, Mosekilde L, Risteli L, Risteli J. Serum markers
19 of type I collagen formation and degradation in metabolic bone disease: correlation
20 with bone histomorphometry. *J Bone Miner Res* 1993; 8:127-32
- 21 33. Saldanha JB, Pimentel, SP, Casati MZ, Sallum AW, Sallum EA, Nociti FH.
22 Histologic evaluation of effect of nicotine administration on bone regeneration, a
23 study in dogs. *Braz Oral Res* 2004; 18:345-9.
- 24 34. Hollinger JO, Schmitt JM, Hwang K, Soleymani P, Buck D. Impact of nicotine on
25 bone healing. *J Biomed Mater Res* 1999; 45:294-301.
- 26 35. King GJ, Keeling SD, McCoy EA, Ward TH. Measuring dental drift and
27 orthodontic tooth movement in response to various initial forces in adult rats. *Am J*
28 *Orthod Dentofacial Orthop* 1991; 99:456-65.
- 29 36. Holbrook TL, Connor EB. A prospective study old alcohol consumption and bone
30 mineral density. *British Medical J* 1993; 306:1506-09.
- 31 37. Frankham P, Cabanac M. Nicotine lowers the body-weight set-point in male rats.
32 *Appetite* 2003; 41:1-5.

38. Grunberg NE, Bowen DJ, Winders SE. Effects of nicotine on body weight and food consumption in female rats. Psychopharmacology 1986; 90:101-05.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13

2. ARTIGO EM INGLÊS

1 TITLE PAGE

2
3 **EFFECT OF NICOTINE AND ETHANOL IN BONE NEOFORMATION DURING**
4 **ORTHODONTIC MOVEMENT IN RATS**

5
6 **Adriana Cristina Rocha,**

7 Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil

8 School of Health and Biosciences

9 Postgraduate Program in Dentistry – Orthodontics

10 Email: adricristina.rocha@gmail.com

11
12 **Aline Cristina Batista Rodrigues Johann, CD, PhD**

13 Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil.

14 School of Health and Biosciences

15 Postgraduate Program in Dentistry – Stomatology

16 Email: aline.johann@pucpr.br

17
18 **Elisa Souza Camargo, CD, PhD**

19 Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil

20 School of Health and Biosciences

21 Postgraduate Program in Dentistry – Orthodontics

22 Email: escamargo@uol.com.br

23
24 Corresponding author

25 **Profa. Dra. Elisa Souza Camargo, CD, PHD**

26 Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Escola de Saúde e Biociências

27 Programa de Pós-graduação em Odontologia – Ortodontia

28 Rua Imaculada Conceição, 1155, Bairro Prado Velho

29 CEP: 80215-901 – Curitiba, Paraná, Brasil

30 Fone: (55) 41 32711637/ Fax (55) 41 32711405

31 E-mail: escamargo@uol.com.br

1 ABSTRACT

2
3 **Introduction:** The objective of this research was to evaluate the action of 1 mg/kg of
4 nicotine and 20% ethanol on bone formation and tooth displacement during
5 orthodontic movement. **Methods:** Two hundred male Wistar rats were divided into 4
6 control groups (CGs) without tooth-movement devices (CG I: saline; CG II: nicotine;
7 CG III: ethanol; and CG IV: nicotine and ethanol), and 4 experimental groups (EGs),
8 with tooth-movement devices (EG I: saline, EG II: nicotine; EG III: ethanol; and EG
9 IV: nicotine and ethanol). After 30 days of drug administration, an orthodontic device
10 applying 25 cN of force was installed in the EGs to mesialize the first maxillary
11 molars. The rats were killed at 32, 44, and 58 days after the start of the experiment.
12 The collagen was evaluated by picrosirius red staining, and tooth displacement rates
13 were measured on dental casts. Data were analyzed statistically. **Results:** After 28
14 days, EG IV showed a lower percentage of type I collagen formation (15.72%) than
15 EG I ($p<0.05$); and EG III and also showed a smaller percentage of type I collagen
16 than CG II (18.45%) and CG III (21.03%), respectively ($p <0.05$). On day 28, EG II
17 showed a lower tooth displacement rate (32.53%) than EG I ($p<0.05$). **Conclusions:**
18 Nicotine and ethanol were associated with delayed bone formation and decreases in
19 the percentage of mature collagen fiber formation. Further, nicotine decreased tooth
20 displacement rates.

1 INTRODUCTION

2
3 Nicotine (*Nicotianatabacum*) is the most active component present in tobacco
4 and directly or indirectly affects cell metabolism. It also has negative effects on
5 homeostasis in the cardiovascular system, autonomic nervous system, endocrine
6 system, and bone.^{1, 2, 3} As the main component of cigarettes, it has a negative effect
7 on bone tissue and may cause vasoconstriction and thrombosis, stimulate tissue
8 ischemia, increase peri-implant loss, and reduce the activity of osteogenic bone
9 cells.¹ Smoking can thus negatively influence orthodontic treatment, as it interferes
10 in the bone remodeling process that is essential for tooth movement.^{4, 5} However,
11 Gao et al⁶ reported that the mechanisms by which cigarettes have a negative effect
12 on bone are not well understood.⁶

13 Alcohol can also change the process of bone remodeling both directly and
14 indirectly: directly, because excessive alcohol consumption compromises the bone
15 formation process by inhibiting the activity of osteoblasts,⁷ and indirectly, because too
16 much alcohol can cause biochemical changes in bone tissue through the decrease in
17 DNA synthesis and the acceleration of osteoblast apoptosis.⁵ Ethanol also acts on
18 the modulation of hormones regulating metabolism (vitamin D metabolites,
19 parathyroid hormone, and calcitonin) and may cause liver disease and nutritional
20 disability.⁸ The effect of alcohol on bone tissue appears to be influenced by the
21 individual's stage of development, the time of consumption, the consumption level,
22 and the individual's gender.¹² There is evidence that alcohol causes an imbalance in
23 bone remodeling, with a predominance of bone resorption in young adults.^{9, 10}

24 Orthodontic movement is based on the complex process of bone remodeling,
25 in which a biomechanical force is applied to a tooth and transmitted to the adjacent
26 tissues; events that cause chemical, mechanical, and cellular changes.^{11, 12} Soares et
27 al³ concluded that ethanol or nicotine consumption can independently cause negative
28 effects on the bone, including reducing bone formation around implants. However,
29 when ethanol and nicotine are administered simultaneously, the negative effects on
30 bones increase.³

31 A significant proportion of the world's population both drink alcohol and smoke
32 cigarettes;¹³ some also do so while undergoing orthodontic treatment. Knowing the
33 influence of these solutions on bone tissue and the fact that orthodontic treatment is

a bone-dependent process, it is important to evaluate the possible effects of nicotine and ethanol, as well as the combination of these substances, in induced tooth movement.

As our literature review indicated, no studies have specifically examined the effects of both alcohol and nicotine on tooth movement; therefore, the objective of this study was to evaluate bone formation and tooth displacement during orthodontic movement in rats, under the action of 1 mg/kg of nicotine daily and 20% ethanol using the binge pattern standard.

MATERIAL AND METHODS

This study was approved by the Ethics Committee for Animal Use in Research of the Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) (# 779).

Sample

The study sample consisted of 200 male *Wistar* rats (*Rattus norvegicus albinos*), approximately 9 weeks old and, weighing 300–350 grams. The animals were supplied and maintained by the vivarium of the PUCPR, where all care in relation to hygiene, lighting, ventilation, and feeding were observed following the recommendations and ethical guidelines of the Canadian Council on Animal Care.¹⁴

The animals had access to water and *ad libitum* food, throughout the experiment. Before installation of the tooth movement devices, the rats were provided with solid food; after device installation, the food was served crushed to prevent any damage to the orthodontic appliances and to facilitate the feeding of animals.

The rats were randomly divided into 8 groups (Table I, p. 30). The solution administration was performed throughout the experimental period for all groups. The control group (CG) animals were killed by overdoses of anesthetic (270 mg/kg of ketamine and 30 g/kg of xylazine) injected intraperitoneally at 32, 44, and 58 days after beginning of the experiment, according to the sub-group they had been assigned. In the experimental group (EG) animals, orthodontic movement was initiated on day 30, and the rats were killed on days 32, 44, and 58 after the start of the experiment, after 2, 14, and 28 days of tooth movement, respectively.

Ethanol and saline were administered intraperitoneally. The ethanol was set at binge-pattern levels to mimic the pattern of use, and administered continuously for 4 days, followed by 3 days of abstinence.⁸ Nicotine (Nicotine hemisulphate; Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO, USA), prepared previous to the experiment, was homogenized and diluted using saline for a concentration of 1 mg/kg, and subcutaneously administered on the backs of the animals every day until euthanasia.³

All animals were weighed every week, with the aid of an electronic precision balance scale (Gehaka - BG 4001, São Paulo, Brazil) in order to adjust doses of the administered substances. The changes in body mass were calculated by subtracting the rat's final masses from their initial masses.

Table I. Description of the groups according to the substance used

CONTROL				EXPERIMENTAL			
CG I n=15	CG II n=21	CG III n=21	CG IV n=21	EG I n=30	EG II n=30	EG III n=30	GEG IV n=29
Saline 0,9% (3g/kg/day)	Nicotine (1mg/kg)	Ethanol 20% (3g/kg/dia)	Nicotine (1mg/kg) and Ethanol 20% (3g/kg/day)	Saline 0,9% (3g/kg/day)	Nicotine (1mg/kg)	Ethanol 20% (3g/kg/dia)	Nicotine (1mg/kg) and Ethanol 20% (3g/kg/day)

Orthodontic movement

Tooth movement was carried out using an orthodontic device consisting of a nickel-titanium spring that transmitted a reciprocal force of 25cN¹⁵ on the first upper right molar and the central incisor, measured by a previously calibrated dynamometer (Haag-Streit AG, Koeniz, Switzerland). After the initial activation, the spring was not reactivated during the experiment; however, its position was checked daily.

Histotechnical processing

Following euthanasia, the right hemimaxillas of the animals were removed, stored in 10% formaldehyde, and sent to the Experimental Pathology Laboratory of the PUCPR for processing.

For each piece, we obtained 6 cross-sections from the cervical third of the mesiobuccal maxillary first molar root, cut into 4- μ m-thick sections, with the occlusal surface of the molar parallel to the microtome and an interval of 60 μ M between each section.

The picrosirius cuts were evaluated using light microscopy. The images were captured and analyzed in the morphometry program of the Image Pro-Plus 4.5 software (Media Cybernetics, Rockville, MD) to obtain the percentage of mature and immature collagen areas in the alveolar bone.¹⁶ Type I collagen (mature collagen) presented as a red-orange color, while type III collagen (immature) presented as a yellow-green color.¹⁶ The adjacent bone distal side of the root was chosen for evaluation, because during orthodontic movement, bone is deposited in the alveolar wall of the side traction side.¹¹

Tooth displacement rate

To assess the rate of displacement, dental impressions were taken of the upper dental arch of the rats at the beginning (before installation of the orthodontic devices) and the end of the experiment (after euthanasia). To this end, the animals were anesthetized (sodium pentobarbital; Syntec, Cotia, Brazil) and molded with silicone condensation-based polydimethylsiloxane (Vigodent COLTÈNE, Rio de Janeiro, Brazil). The models were made of plaster type IV (IV Durone Plaster Stone; Dentsply, Petrópolis, Brazil).

The distance from the upper incisor palatal face up to the mesial surface of the maxillary right first molar was measured using a digital caliper (Absolute-Mitutoyo, Kawasaki-Shi, Japan). The rate of tooth displacement was calculated by subtracting the final distance from the initial distance.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using SPSS software (version 22.0; SPSS IBM, Armonk, NY). The significance level for all statistical tests was 0.05.

We used the Shapiro–Wilk test to identify any statistically significant differences in the mean values of the variables of type I collagen percentage in the alveolar bone, the tooth movement rate, and the variations in body weight, according to group and time, as well as to test for data normality. Subsequently, we used the Levene variance homogeneity test to examine the homogeneity of the variances between different treatments.

Once the groups were normally distributed ($p > 0.05$), we compared the mean values according to group and time using the analysis of variance (ANOVA) parametric test with the 2-criteria, full-factorial design. When the ANOVA indicated difference, and when the treatments showed heterogeneous variance ($p < 0.05$), we compared the treatments of the 2 by 2 using a parametric Games-Howell test for multiple comparisons with heterogeneous variances. Otherwise, we used the Tukey multiple comparison test for homogeneous variances. For each of the dependent variables according to group $\times$ time, we calculated the observed power for each factor and the interaction of group $\times$ time (Power analysis).

RESULTS

Bone Neoformation

In the assessment of type I collagen, the comparison of the independent groups' time to the control groups' time showed no statistically significant difference ($p > 0.05$); a difference was observed, however, for the EGs ($p < 0.05$). The EG III showed lower percentages of collagen formation compared to the EG I (10.58%) and EG II (11.53%) (Table II, p. 34) (*Power analysis*: $> 90\%$).

In the relation of group $\times$ time, when comparing the CGs to each other, no statistically significant difference was observed ($p > 0.05$) (Table III, p. 34). In comparing the EGs with each other, there was a statistically significant difference on

1 day 28; the EG IV smaller percentage of collagen formation (15.72%) than the EG I
2 ($p<0.05$) (Table IV, p. 35) (*Power analysis*.>90%).

3 In the comparison between the CGs and the EGs according to group x time,
4 there was a statistically significant difference ($p<0.05$) (Table V, p. 35). On day 28,
5 EG III showed a lower percentage of collagen formation (18.45%) than CG III, and
6 EGIV showed a lower percentage of collagen formation (21.03%) than CG IV ($p<$
7 0.05) (*Power analysis*.>90%).

Table II. Comparisons of the variable percentage of type I collagen (%) among independent groups' time (EGs)

EG I	Mean $\pm$ DP				Comparisons				Power analysis
	EG II	EG III	EG IV	EG I x EG II	EG I x EG III	EG I x EG IV	EG II x EG III	EG II x EG IV	EG III x EG IV
88,72 $\pm$ 8,99	89,67 $\pm$ 6,91	79,33 $\pm$ 11,98	87,62 $\pm$ 10,24	0,9998	0,0241	0,9998	0,0039	0,9846	0,1017
* Significance level of the Games-Howell test was: $p < 0.05$									
									1,0000

Table III. Comparisons of the variable percentage of type I collagen (%) in relation group x time (CGs)

Groups/ Time	Mean $\pm$ DP				Comparisons						Power analysis
	CG I	CG II	CG III	CG IV	CG I x CG II	CG I x CG III	CG I x CG IV	CG II x CG III	CG II x CG IV	CG III x CG IV	
2 Days	97,45 $\pm$ 0,99	97,79 $\pm$ 0,34	92,89 $\pm$ 1,21	95,29 $\pm$ 1,08	1,0000	0,4589	0,9917	0,1918	0,7963	0,9915	1,0000
14 Days	93,45 $\pm$ 1,79	90,01 $\pm$ 1,77	94,44 $\pm$ 0,70	95,85 $\pm$ 0,43	0,9940	1,0000	0,9867	0,7490	0,9883	0,9632	
28 Days	96,35 $\pm$ 1,18	93,33 $\pm$ 2,62	98,41 $\pm$ 0,42	97,77 $\pm$ 0,47	0,9997	0,9536	0,9985	0,8973	0,9575	0,9999	

Control Groups (CG): CG I – Saline, CG II – Nicotine, CG III – Ethanol, CG IV – Nicotine and ethanol. Experimental Groups (EG): EG I – Saline, EG II – Nicotine, EG III – Ethanol, EG IV – Nicotine and ethanol.

Table IV. Comparisons of the variable percentage of type I collagen (%) in relation group x time (EGs)

Groups/ Time	Mean ± DP				Comparisons								Power analysis				
					EG I x EG II		EG I x EG III		EG I x EG IV		EG II x EG III			EG II x EG IV		EG III x EG IV	
	EG I	EG II	EG III	EG IV													
2 Days	86,94 ± 2,54	93,95 ± 1,77	73,49 ± 4,32	91,59 ± 2,26					0,7952	0,5631	0,9979	0,0633	1,0000	0,1523			
14 Days	87,61 ± 3,62	89,18 ± 1,84	84,26 ± 2,97	93,02 ± 2,61					1,0000	0,9999	0,9995	0,9962	0,9996	0,8220			1,0000
28 Days	91,60 ± 2,23	85,88 ± 2,27	80,25 ± 3,49	77,20 ± 2,45					0,9626	0,5301	0,0448	0,9977	0,6083	1,0000			

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

Table V. Comparison of the variable percentage of type I collagen (%) in relation group x time (CGs and EGs)

Groups/ Time	Mean ± DP								Comparisons				Power analysis
	CG I	CG II	CG III	CG IV	EG I	EG II	EG III	EG IV	CG I x EG I	CG II x EG II	CG III x EG III	CG IV x EG IV	
2 Days	97,45 ± 0,99	97,79 ± 0,34	92,89 ± 1,21	95,29 ± 1,08	86,94 ± 2,54	93,95 ± 1,77	73,49 ± 4,32	91,59 ± 2,26	0,1408	0,8408	0,0811	0,9923	
14 Days	93,45 ± 1,79	90,01 ± 1,77	94,44 ± 0,70	95,85 ± 0,43	87,61 ± 3,62	89,18 ± 1,84	84,26 ± 2,97	93,02 ± 2,61	0,9935	1,0000	0,2915	0,9998	0,998
28 Days	96,35 ± 1,18	93,33 ± 2,62	98,41 ± 0,42	97,77 ± 0,47	91,60 ± 2,23	85,88 ± 2,27	80,25 ± 3,49	77,20 ± 2,45	0,9332	0,8433	0,0329	0,0017	

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

Control Groups (CG): CG I – Saline, CG II – Nicotine, CG III – Ethanol, CG IV – Nicotine and ethanol. Experimental Groups (EG): EG I – Saline, EG II – Nicotine, EG III – Ethanol, EG IV – Nicotine and ethanol.

Table VI. Comparisons of the varying tooth displacement rate (mm) in relation group x time (EGs)

Mean ± DP					Comparisons								Power analysis
Groups/ Time	EG I	EG II	EG III	EG IV	EG I x EG II	EG I x EG III	EG I x EG IV	EG II x EG III	EG II x EG IV	EG III x EG IV			
2 Days	6833 ± 58452	4538 ± 51416	9571 ± 65792	6933 ± 66490	0,9999	0,9977	1,0000	1,0000	1,0000	0,9910	0,6686		
14 Days	3000 ± 25298	3000 ± 30128	5444 ± 69841	4400 ± 49486	1,0000	0,9986	1,0000	1,0000	0,9983	1,0000			
28 Days	5400 ± 51769	3643 ± 31527	3889 ± 27131	5818 ± 47920	0,0479	1,0000	1,0000	0,303	0,9629	0,9993			

* Significance level of the Tukey test: $p < 0,05$.

Table VII. Means and standard deviations of body weight changes (g) in the CGs and EGs

Groups/ Time	Mean ± DP								Comparisons				Power analysis
	CG I	CG II	CG III	CG IV	EG I	EG II	EG III	EG IV	CG I x EG I	CG II x EG II	CG III x EG III	CG IV x EG IV	
2 Days	-7,83± 16,77	16,57 ±31,8	9,85 ± 23,95	-5,28 ± 20,02	-3,94± 14,09	17,2± 9,89	11,6 ± 11,52	9,59 ± 17,05	0,1408	0,8408	0,0811	0,9923	0,998
14 Days	-20,45 ± 8,79	9,42 ± 10,92	-10,5± 10,58	-9,71 ± 8,44	-1,80± 18,80	-0,71 ±15,81	3,50 ± 22,22	7,0 ± 14,75	0,9935	1,0000	0,2915	0,9998	
28 Days	-12,00 ±14,1	-21,00 ±7,74	-2,62 ± 19,46	-10,57 ±12,5	-0,70 ± 25,5	6,89 ±23,81	20,70 ± 16,9	25,44 ± 12,6	0,9332	0,8433	0,0329	0,0017	

* Significance level of the Games-Howell test was: $p < 0,05$

Control Groups (CG): CG I – Saline, CG II – Nicotine, CG III – Ethanol, CG IV – Nicotine and ethanol. Experimental Groups (EG): EG I – Saline, EG II – Nicotine, EG III – Ethanol, EG IV – Nicotine and ethanol

Tooth displacement rate

When we compared the tooth displacement rates between independent groups' time, there were no statistically significant differences ($p>0.05$).

In the relationship of group x time, the EGs showed statistically significant differences ($p<0.05$). On day 28, EG II showed lower tooth displacement rates (32.53%) in relation to EG I ($p<0.05$) (Table VI, p. 36) (Power analysis.>60%).

Body Mass

In comparing the groups independently of time, it was observed that in all the CGs. except for CG II, there was an increase in body weight (Figure 1, p. 38), and for all the EGs, except for EG I, there was a decrease in body weight (Figure 1, p. 38).

There were statistically significant differences in body weight changes in the rats when they were compared using group x time ($p<0.05$) (Table VII, p. 36). On day 28, CG IV showed less variation in body mass when compared to EG IV. At the same time, the CG III group showed less variation in body mass when compared to EG III (Table VII, p. 36) (Power analysis.>90%).

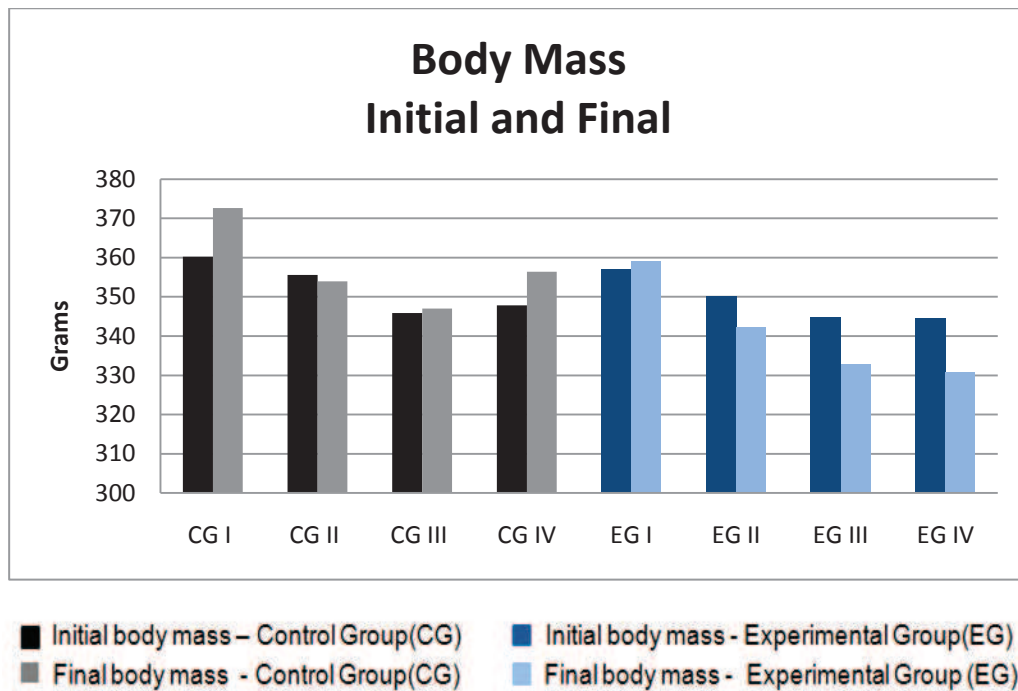


Figure 1. Representation of the body weights for both the control and the experimental groups at the beginning and the end of the experiment.

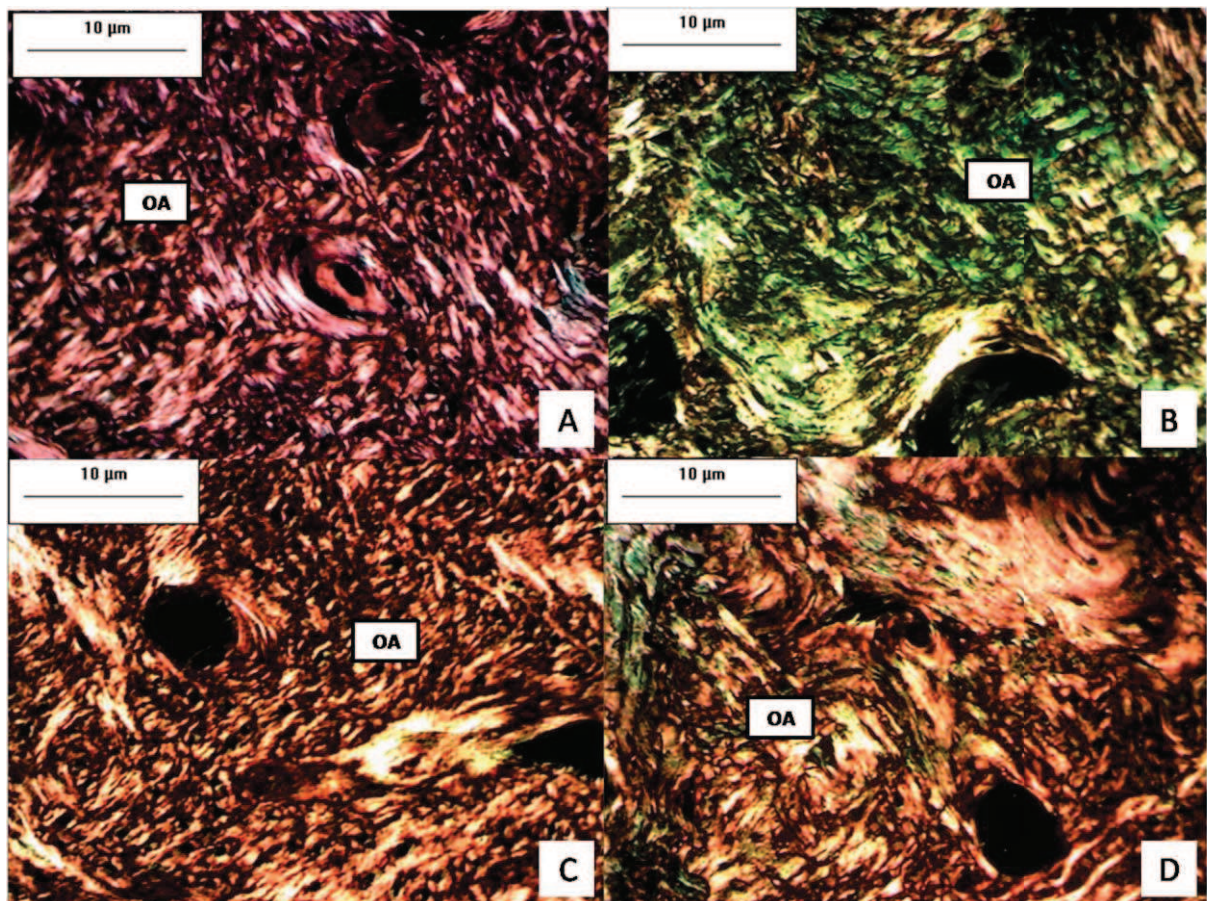


Figure 2. Photomicrograph blade of the distal side of the mesiobuccal root of the maxillary right first molar. The CG IV which received nicotine and ethanol (A), and the CG III, which received ethanol (C), showed a predominance of type I collagen; the EG IV, which received nicotine and ethanol and an orthodontic device for tooth movement (B), and the EG III, which received ethanol and the tooth movement device (D), showed a predominance of type III collagen, on day 28. OA indicates alveolar bone. Picrosirius red staining was at a magnification of 200×.

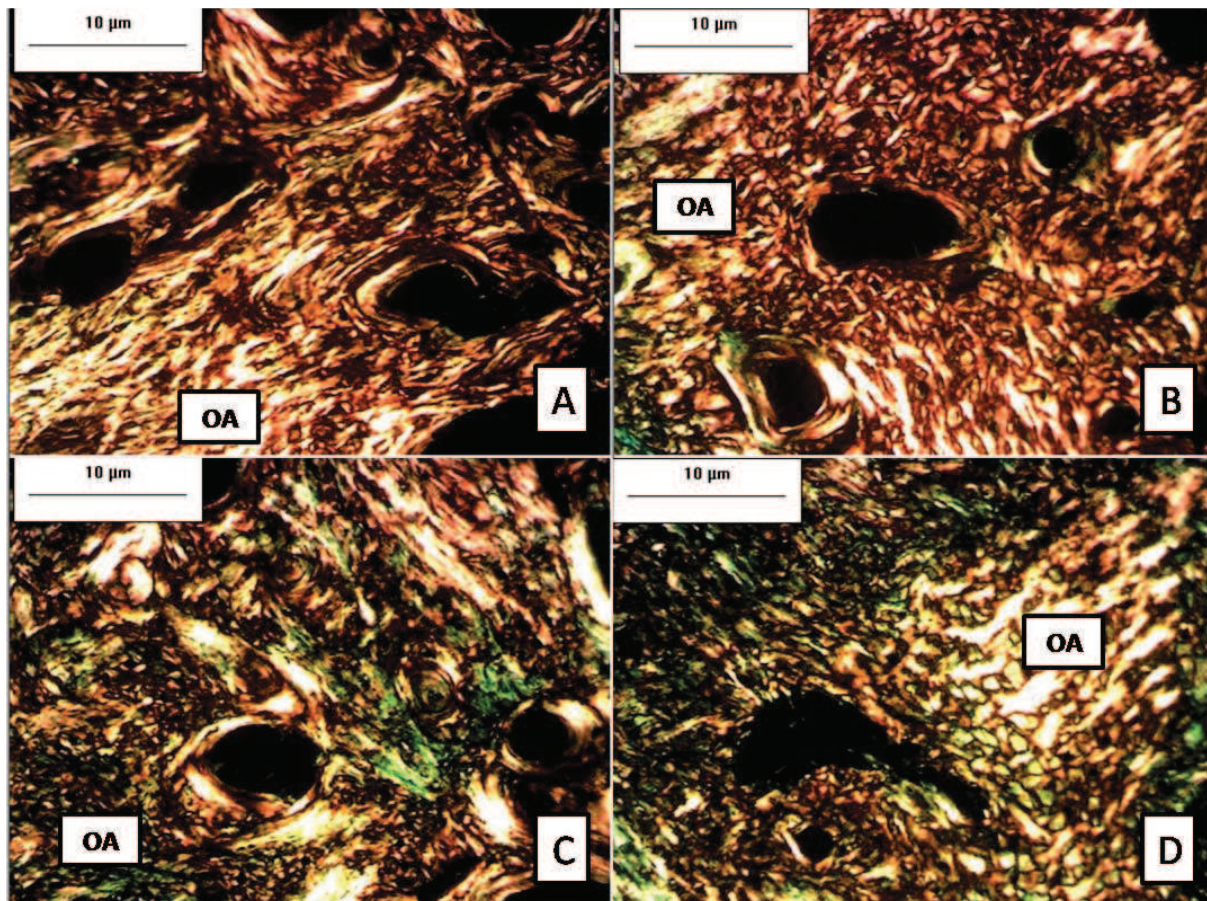


Figure 3. Photomicrograph blade of the distal side of the mesiobuccal root of the maxillary right first molar. EG I - Saline (A), EG II - Nicotine (B), EG III- Ethanol (C) and EG IV- Nicotine and Ethanol (D) on 28 day. OA indicates alveolar bone. Picrosiriusred staining was at a magnification of 200×.

DISCUSSION

In many parts of the world, alcohol and tobacco are regarded as illegal drugs, and yet are widely consumed by the population.²⁰ It is known that the combination of these 2 substances can have potentially harmful effects on both tissue and bone^{21,22} arrays, as well as causing changes at the cellular level, including increasing the chances of developing neoplasms.²⁰

The binge pattern of alcohol consumption was chosen for the study because it is the chronic consumption method typically observed among American teens,²¹ and

age group for which orthodontic treatment is commonly performed.²² We used ethanol diluted to 20% (and observed bone and tissue changes at days 32, 44 and 58); the same dosage has been used in some studies, such as Camilli et al.²³ who observed changes in osteogenesis, and concluded that the action of ethanol decreased the volume of new bone formation in rats. Likewise, Diez et al²⁴ reported that mice treated with 30% ethanol for 6 weeks showed a marked reduction in mineral metabolism; Sampson²⁵ used the same dose for 4 weeks and concluded that several cell components were changed. Furthermore, even lower doses of ethanol (15%) for 5 weeks, can inhibit or delay the fracture repair process in rats.²⁶

Similar to the studies of Soares et al³ and Fávoro et al²⁷ we opted to use a 1mg/kg dose of nicotine to be compatible with the average concentration of absorbed nicotine in smokers who consume 15–20 cigarettes per day. Subcutaneous administration was also used in other studies.^{28, 29} and is recommended by the drug's manufacturer, who indicates that the synthetic drug is highly toxic and should be administered by a route of slow absorption.

In our results, the association of ethanol and nicotine influenced bone formation (Table IV, p. 35), as the group that received both substances and underwent tooth movement (EG IV) showed only a minor percentage of type I collagen formation compared to the other EGs. This was statistically significant when compared to the group receiving saline (EG I). Our result are compatible with those of Vasconcelos et al¹⁰ who evaluated the association effect of ethanol and nicotine on the bone of rats with induced periodontal disease, and reported a reduction of newly formed bone volumes, as well as changes in the bones' mechanical strength.

Similarly, Callaci et al³⁰ noted an increase in collagen type I degradation under the effect of ethanol. Klein and Sampson^{7, 25} proved that ethanol can inhibit the proliferation of osteoblasts and decrease bone mass. Conversely, Maran et al³² found no significant interference of ethanol on type I collagen fibers, but this study was conducted in cultures of human fetal osteoblasts and ethanol was only administered for 7 days.

The animals in the CG who received only ethanol and those who received nicotine and ethanol, showed more collagen type I formation than the corresponding groups with tooth movement. This result was expected, since most of the organic matrix consists of collagen type I, through which the bone resorption caused by tooth

1 movement is degraded and subsequently repaired by deposition of immature type III
2 collagen fibers.^{11, 30, 32}

3 In our study, the administration of nicotine alone had no direct effect on bone
4 formation, as the collagen of animals receiving this substance was similar to the other
5 groups. This result is contrary to the findings of Saldanha et al³³ who found that small
6 doses of nicotine in dogs changed newly formed bone. Likewise, Shintcovsk et al⁵
7 observed delays in the collagen maturation process; however, these authors used 2
8 mg/kg of nicotine, a higher dose than that used in this study.

9 Even though our results did not indicate alteration of collagen alone in the
10 groups that received nicotine, dental displacement rates at day 28 were smaller in
11 rats that received this solution (EG II) (Table VI, p. 35), indicating that nicotine
12 appeared to delay the orthodontic movement. Unlike our results, Shintcovsk et al⁵
13 and Sodagar et al⁴ found that daily doses of nicotine can accelerate tooth movement
14 in rats. The various dosages exposure times, and administration routes could justify
15 the conflicting results between these studies.

16 According to Hollinger,³⁴ the deposition of new bone matrix is related to the
17 different administered concentrations of nicotine. Those who either did not receive or
18 received lower doses of nicotine showed more new bone deposition, while those who
19 received higher doses did not. King³⁵ observed, in an in-vitro study, that nicotine had
20 an effect on the proliferation and differentiation of osteoblasts, which might influence
21 bone metabolism.

22 Regarding bone changes in animals caused by chronic alcohol use, there are
23 doubts as to whether these are due to the effect of using ethanol or are the
24 consequence of possible nutritional impairment.³⁶ Thus, we considered it vital to
25 control the body mass of the animals and the adequacy of the drug doses in relation
26 to body mass.

27 We found that the rats of groups EG II, GE III and GE IV showed decreases in
28 body weight throughout the experiment (Figure 1, p. 38), possibly due to the fact that
29 these animals had been submitted to orthodontic movement, as well as management
30 solutions. In addition, the animals in EG III and GE IV who were given more time with
31 the orthodontic appliance (28 days), showed larger decreases in body mass
32 compared to the 2 corresponding CGs (CG III and GC IV) (Table VII, p. 36).
33 According to King,³⁵ orthodontic devices installed in animals' oral cavities can cause

1 great discomfort, difficulty in food intake, and changes in weight. However, the rats of
2 the groups that received saline only, with and without tooth movement showed
3 increased body mass, perhaps due to the fact they were not affected by the harmful
4 effects of nicotine and/or ethanol³⁷ (Figure 1, p. 38).

5 The groups that received administration of nicotine alone, with and without
6 tooth movement, showed decreases in body mass (Figure 1, Page 38). This
7 corroborates studies^{37,38} that found that this alkaline substance acts on the
8 hypothalamus as an appetite suppressant.

9 Different methods have been used to evaluate the effects of nicotine and
10 alcohol on bone tissue. In the present study, we observed that the combination of
11 ethanol and nicotine affected bone formation, when assessed at the end of the
12 experiment, which could hinder tooth movement. Similarly, nicotine alone reduced
13 the amount of tooth movement. Therefore, based on this study, we can infer that
14 those who either smoke and drink or only smoke can damage the processes related
15 to orthodontic movement. However, more studies are required to better demonstrate
16 the effects of these drugs on bone metabolism and their direct influence on tooth
17 movement.

20 CONCLUSIONS

21
22 We concluded that the administration of nicotine, ethanol, and the combination
23 of both during orthodontic movement in rats:

- 24 • Nicotine favors loss of body mass of the animals acting as an appetite
25 suppressant;
- 26 • Nicotine and ethanol were associated with delayed bone formation.
27 decreasing the percentage of mature collagen fibers;
- 28 • Nicotine decreased tooth displacement.

1 REFERENCES

- 2
- 3 1. Zhu BQ, Parmley WW. Hemodynamic and vascular effects of active and passive
- 4 smoking. *Am Heart J* 1995; 130:1270-75.
- 5 2. Theiss SM, Boden SD, Hair G, Titus L, Morone MA, Ugbo J. The effect of nicotine
- 6 on gene expression during spine fusion. *Spine* 2000; 25:2588-94.
- 7 3. Soares EV, Fávaro WJ, Cagnon VH, Bertran CA, Camili JA. Effects of alcohol and
- 8 nicotine on the mechanical resistance of bone and bone neoformation around
- 9 hydroxyapatite implants. *J Bone Miner Metab* 2010; 28:101-7.
- 10 4. Sodagar A, Donyavi Z, Arab S, Kharrazifard MJ. Effect of nicotine on orthodontic
- 11 tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2011; 139:261-5.
- 12 5. Shintcovsk RL, Knop L, Tanaka OM, Maruo H. Nicotine effect on bone remodeling
- 13 during orthodontic tooth movement: Histological study in rats. *Dental Press J Orthod*
- 14 2014; 19:96-107.
- 15 6. Gao SG, Li KH, Xu M, Jiang W, Shen H, Luo W et al. Bone turnover in passive
- 16 smoking female rat: relationships to change in bone mineral density. *BMC*
- 17 *Musculoskelet Disord* 2011; 12:131.
- 18 7. Klein RF. Alcohol-Induced bone disease: impact of ethanol on osteoblast
- 19 proliferation. *Alcohol* 1997; 21:392-9.
- 20 8. Lieber CS. Alcohol and the liver: metabolism of alcohol and its role in hepatic and
- 21 extrahepatic diseases. *Mt Sinai J Med.* 2000;67:84- 94.
- 22 9. Hogan HA, Argueta F, moe I, Nguyen IP, Sampson W. Adult-onset alcohol
- 23 consumption induces osteopenia in female rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25:746-
- 24 54.
- 25 10. Vasconcelos DFP, Silva MAD, Rocha MM, Gibilini C, Vasconcelos ACG, Barros
- 26 SP. Effects of simultaneous nicotine and alcohol use in periodontitis progression in
- 27 rats: a histomorphometric study. *J Clin Exp Dent* 2013; 5:95-9.
- 28 11. Wolff J. The law of bone remodeling. Berlin, Germany: Springer-Verlag 1986; 1-
- 29 22.
- 30 12. Hamaya M, Mizoguchi I, Sakakura Y, Yajima T, Abiko Y. Cell death of osteocytes
- 31 occurs in rat alveolar bone during experimental tooth movement. *Calcif Tissue Int*
- 32 2002; 70:117-26.

13. World Health Organization Global Information System on Alcohol and Health (GISAH) (online database). (<http://www.who.int/gho/alcohol>) 2004.
14. Canadian Council on Animal Care. Guide to the Care and Use of Experimental Animals. 1997; 1:2.
15. Ribeiro JS, Maciel JVB, Knop LAH, Machado MN, Grégio AMT, Camargo ES. Effect of Growth Hormone in Experimental Tooth Movement. Braz Dent Journal 2013; 24:5.
16. Borges LF, Gutierrez PS, Marana HR, Taboga SR. Picrosirius-polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapse lesions. Micron 2007; 38:580-3.
17. SESSP- Secretaria de Estado da Saúde de SP – Vigilância epidemiológica. Alcoolismo. (online database). (http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/dic_pr09) 2005.
18. Palmer RM, Wilson RF. Mechanisms of action of environmental factors tobacco smoking. J Clin Periodontol 2005; 6:180-95.
19. Jansson, L. Association between alcohol consumption and dental health. J. Clin Periodontol 2008; 35:379-84.
20. Castellsagué X, Quintana MJ, Martínez MC, Nieto A, Sánchez MJ, Juan A, et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis Intl J Cancer 2004; 108:741-9.
21. Lauing K, Himes R, Rashwaski R, Strotman P, Callaci JJ. Binge alcohol treatment of adolescents rats followed by alcohol abstinence associable with site-specific differences in bone loss and incomplete recovery of bone mass and strength. Alcohol 2008; 42:649-56.
22. Almeida AB, Leite ICG. Orthodontic treatment need for Brazilian schoolchildren: A study using the Dental Aesthetic Index. Dental Press J Orthod 2013; 18:103-9.
23. Camilli JA, Cunha MR, Bertran CA, Kawachi EY. Subperiosteal hydroxyapatite implants in rats submitted to ethanol ingestion. Arch Oral Biol 2004; 44:747-53.
24. Diez A, Serrano S, Cucurull J, Marinoso LL, Bosh J, Prug J, Nogues X, Aubia J. Acute effects of ethanol on mineral metabolism and trabecular bone in Sprague-Dawley rats. Calcifiel Tissue Inter 1997; 61:168-71.
25. Sampson HW. Effects of alcohol consumption on adult and aged bone: a histomorphometric study of the rat animal model. Alcohol Clin Exp Res 2002; 22:2029-34.

- 1 26. Nyquist F, Halvosenv V, Madsen JE, Nordsletten L, Obrant KJ. Ethanol and is
2 effects on fracture healing and bone mass in de male rats. *Acta Orthop Scand* 1999;
3 70:212-6.
- 4 27. Fávaro WJ, Cagnon VH. Morphometric and morphological features of the ventral
5 prostate in rats submitted to chronic nicotine and alcohol treatment. *Tissue Cell* 2006;
6 38:311-23.
- 7 28. Iwaniec UT, Fung YK, Akhter MP, Haven MC, Haynatzki GR, Cullen DM. Effects
8 of nicotine on bone and calciotropic hormones in aged ovariectomized rats. *J*
9 *Musculoskel Neuron Interact* 2002; 2:469-78.
- 10 29. Pinto JR, Bosco AF, Okamoto T, Guerra JB, Piza IG. Effects of nicotine on the
11 healing of extraction sockets in rats. A histological study. *Braz Dent J* 2002; 13:3-9.
- 12 30. 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 Clin*
15 *Exp Res* 2004; 28:182-91
- 16 31. Maran A, Zhang M, Spelsberg TC, Turner RT. The dose-response effects of
17 ethanol on the human fetal osteoblastic cell line. *J Bone Miner Res* 2001; 16:270-6
- 18 32. Eriksen EF, Charles P, Melsen F, Mosekilde L, Risteli L, Risteli J. Serum markers
19 of type I collagen formation and degradation in metabolic bone disease: correlation
20 with bone histomorphometry. *J Bone Miner Res* 1993; 8:127-32
- 21 33. Saldanha JB, Pimentel, SP, Casati MZ, Sallum AW, Sallum EA, Nociti FH.
22 Histologic evaluation of effect of nicotine administration on bone regeneration, a
23 study in dogs. *Braz Oral Res* 2004; 18:345-9.
- 24 34. Hollinger JO, Schmitt JM, Hwang K, Soleymani P, Buck D. Impact of nicotine on
25 bone healing. *J Biomed Mater Res* 1999; 45:294-301.
- 26 35. King GJ, Keeling SD, McCoy EA, Ward TH. Measuring dental drift and
27 orthodontic tooth movement in response to various initial forces in adult rats. *Am J*
28 *Orthod Dentofacial Orthop* 1991; 99:456-65.
- 29 36. Holbrook TL, Connor EB. A prospective study old alcohol consumption and bone
30 mineral density. *British Medical J* 1993; 306:1506-09.
- 31 37. Frankham P, Cabanac M. Nicotine lowers the body-weight set-point in male rats.
32 *Appetite* 2003; 41:1-5.

38. Grunberg NE, Bowen DJ, Winders SE. Effects of nicotine on body weight and food consumption in female rats. *Psychopharmacology* 1986; 90:101-05.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13

3. ANEXOS

1
2

ANEXO I- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA PUCPR



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**.

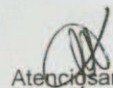
PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

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- METODOLOGIA COMPLEMENTAR

O presente trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais em Pesquisa da PUCPR (#779).

Amostra

A amostra foi constituída por 200 ratos machos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*) com aproximadamente 9 semanas de vida, pesando entre 300 – 350g. Os animais foram fornecidos e mantidos pelo Biotério da PUCPR.

Os ratos eram mantidos em gaiolas de polipropileno forradas com maravalha mantendo no máximo 5 ratos por gaiola. A maravalha era trocada pelo menos duas vezes na semana. A temperatura mantida entre 19° e 22°, umidade em torno dos 55%, o fotoperíodo intercalado em 12 horas claro e 12 horas escuro e a ventilação fazendo de 15 a 20 trocas de ar por dia. A dieta dos animais era à base de água e ração *ad libitum* durante todo experimento. Antes da instalação dos dispositivos para movimentação dentária a ração era fornecida sólida. Após a instalação dos dispositivos a ração passou a ser fornecida triturada no intuito de prevenir eventuais danos à aparelhagem ortodôntica e facilitar a alimentação dos animais.

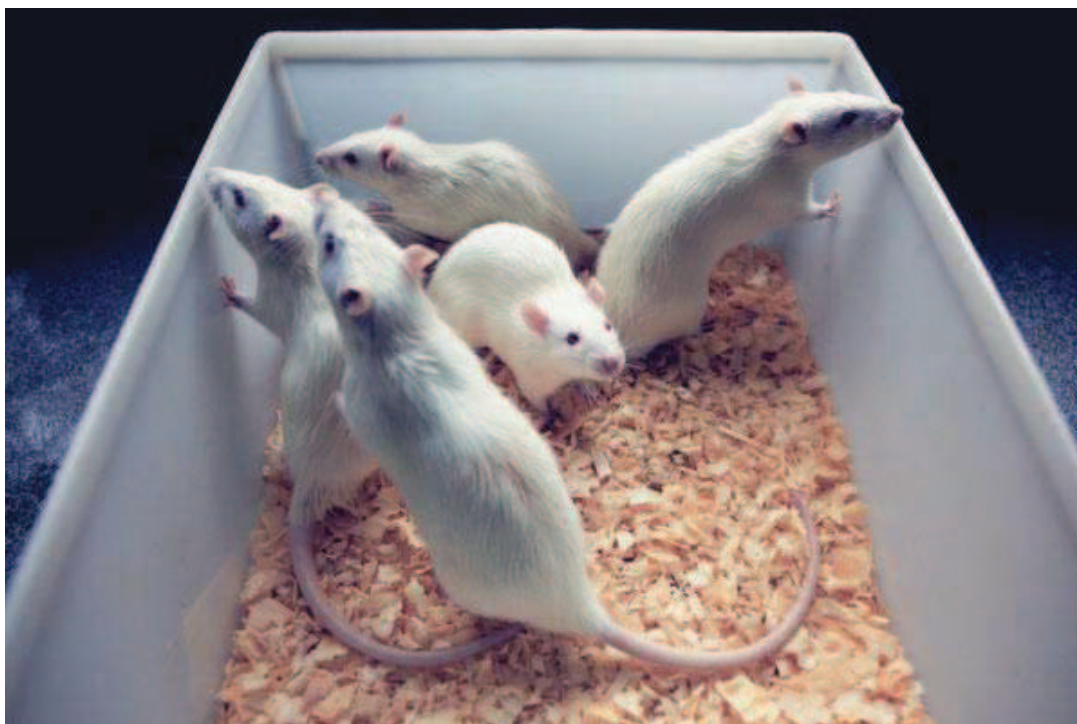


Fig 1. Animais nas caixas de polipropileno no biotério PUCPR.

O dispositivo consiste em uma mola fechada de níquel-titânio (GAC - Dentsply) de 9mm, fixada ao primeiro molar superior direito e aos incisivos centrais, com fio de amarrilho de aço inox (Dental Morelli Ltda. São Paulo, Brasil) de 0,025 milímetros e resina composta fotopolimerizável (Charisma, Heraeus, Hanau, Germany) medida através de dinamômetro (Haag-Streit AG. Koeniz Switzerland, Suíça), previamente calibrado. Após a ativação inicial, a mola não foi reativada durante o período experimental. No entanto, seu posicionamento foi conferido diariamente.

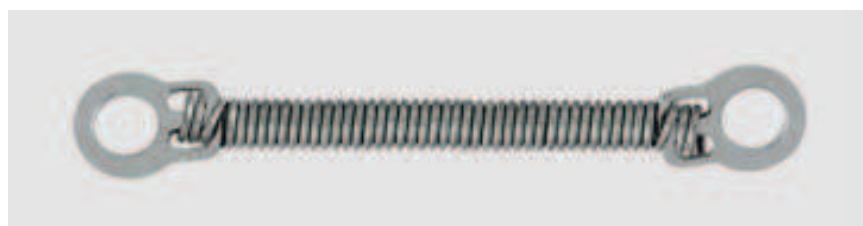


Fig 2. Fotografia ampliada do dispositivo ortodôntico (mola fechada de níquel-titânio GAC- 9 mm) usado no experimento.

Os animais foram divididos aleatoriamente em oito grupos (Tabela I, pág. 53), A administração das substâncias foi realizada durante todo o período experimental, em ambos os grupos. Os animais do grupo controle foram eutanasiados 32, 44 e 58 dias após início do experimento, conforme subgrupo a que pertenciam. Nos animais do grupo experimental, o movimento ortodôntico foi iniciado no 30º dia e a eutanásia foi realizada também 32, 44 e 58 dias após o início do experimento, ou seja, após 2, 14 e 28 dias de movimento dentário.

A administração do etanol e da solução salina ocorreu por via intraperitoneal, mimetizando o padrão Binge de consumo de etanol, administrado por quatro dias subsequentes seguidos por três dias de abstinência. A nicotina (Nicotine hemisulphate, Sigma-Aldrich Chemicals Pvt Ltd St. Louis, MO, EUA) foi administrada via subcutânea, todos os dias sem intervalo até o dia da eutanásia dos animais.

Todos os animais foram pesados semanalmente, com o auxílio de balança eletrônica de precisão (Gehaka – BG 4001, São Paulo, Brasil) a fim de ajustar a dose da substância administrada.

1

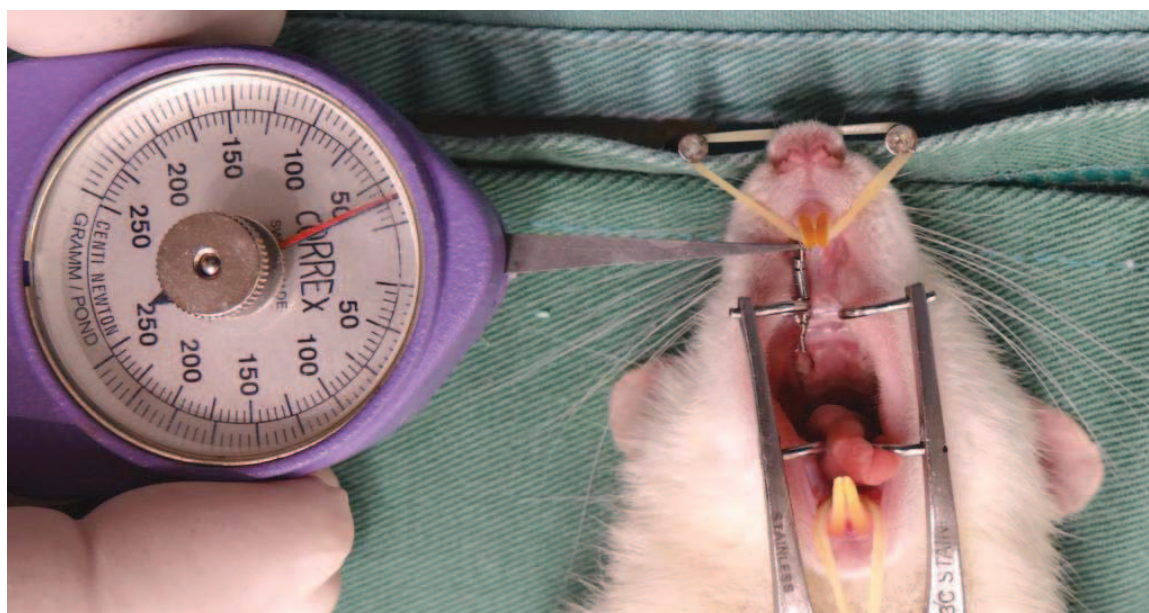
Tabela I. Descrição dos grupos e subgrupos de acordo com a solução utilizada

CONTROLE				EXPERIMENTAL			
GC I	GCII	GC III	GC IV	GE I	GE II	GE III	GE IV
n=15	n=21	n=21	n=21	n=30	n=30	n=30	n=29
Solução Salina 0,9% (3g/kg/dia)	Nicotina (1mg/kg)	Etanol 20% (3g/kg/dia)	Nicotina (1mg/kg) e Etanol 20% (3g/kg/dia)	Solução Salina 0,9% (3g/kg/dia)	Nicotina (1mg/kg)	Etanol 20% (3g/kg/dia)	Nicotina (1mg/kg) e Etanol 20% (3g/kg/dia)

2 Movimento ortodôntico

3 O movimento ortodôntico foi realizado por dispositivo ortodôntico que produziu
4 força recíproca de 25cN, no primeiro molar superior direito e nos incisivos centrais,
5 medida com dinamômetro (Haag-Streit AG. Koeniz.Suíça), previamente calibrado.
6 Após a ativação inicial, a mola não foi reativada durante o período experimental, no
7 entanto, seu posicionamento foi conferido diariamente.

8



9

10

11 **Fig 3.** Fotografia da cirurgia para instalação do dispositivo ortodôntico. Pode-
12 se observar a força sendo mensurada pelo dinamômetro (25cN).

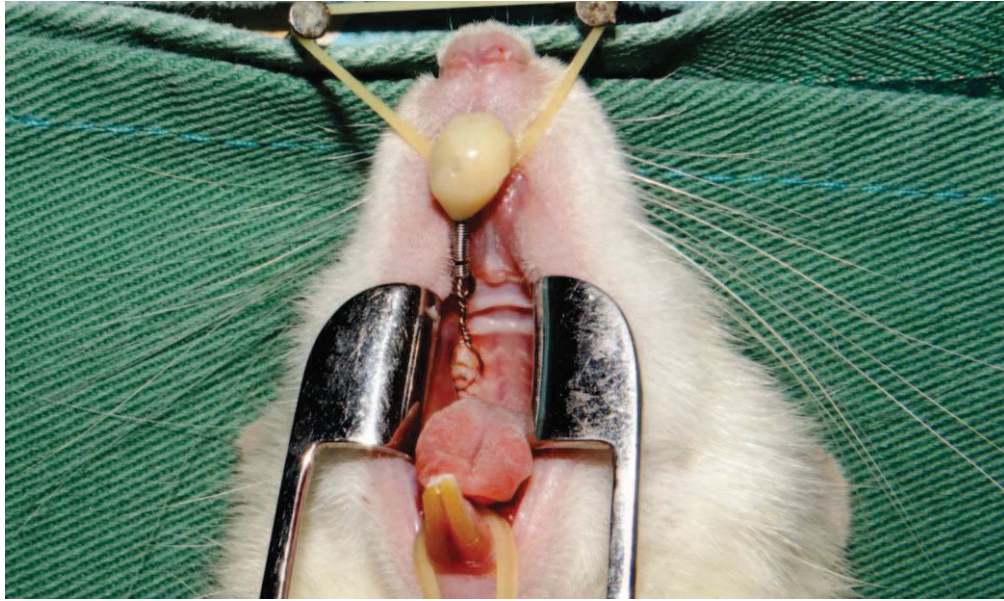


Fig 4. Fotografia do dispositivo ortodôntico instalado. Pode-se observar a mola ativada e a resina composta fixando o dispositivo aos incisivos.

Processamento Histotécnico

Os animais foram mortos por overdose de solução anestésica (Ketamina 80ml – 100g/Kg /Xilazina 2% - 1g/Kg), via intraperitoneal e em seguida as hemimaxilas direitas foram removidas, dissecadas e armazenadas em solução de formol a 10% durante 24 horas.

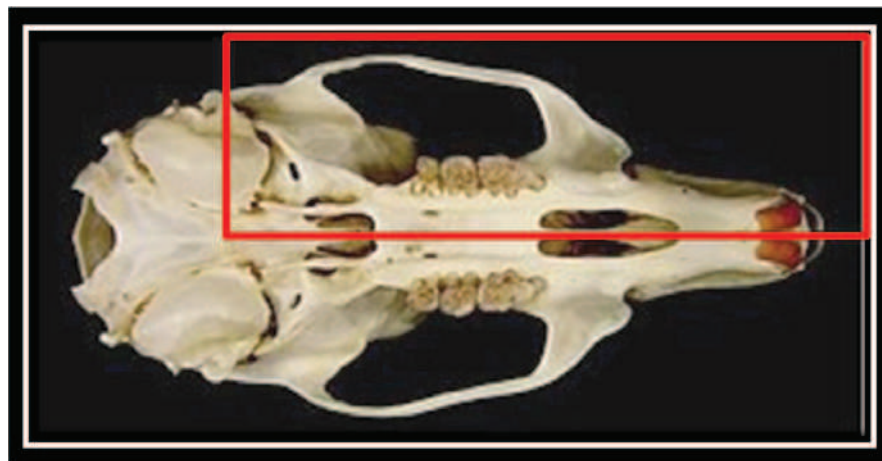


Fig 5. Esquema da secção da peça histológica do crânio do rato. A hemimaxila do lado direito do animal foi selecionada para ser fixada em EDTA a 5% por dois meses.

1 Após dois meses de desmineralização, com solução de
2 etilenodiaminotetracetatodissodico EDTA 5% (Biotec Reagentes Analíticos. Pinhais.
3 Brasil) a 4.13%, as peças foram processadas e emblocadas em parafina no
4 Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR.

5 Para cada peça foram obtidas 06 secções transversais a partir do terço
6 cervical da raiz méso-vestibular do primeiro molar superior, cortadas em micrótomo
7 com 4µm de espessura, com a superfície oclusal do molar paralela ao micrótomo e
8 com intervalo de 60 µm entre cada secção.

9 Para a coloração histoquímica da técnica picrossírius, após a desparafinização
10 em xilol as secções foram incubadas em etanol, hidratadas em água destilada e
11 incubadas por uma hora em solução de Sirius Red (Direct Red80. diluído 0.19% em
12 ácido pícrico saturado. Sigma-Aldrich Chemicals Pvt Ltd, St. Louis, MO, EUA) em
13 temperatura ambiente. A seguir, foi realizada lavagem em água destilada,
14 contracoloração com Hematoxilina de Harris, desidratação em soluções crescentes
15 de álcool, diafanização em xilol e montagem em Entellan.

16 Os cortes para picrossírius foram avaliados sob microscopia de luz. A imagem
17 foi capturada utilizando um microscópio Olympus BX-50 (Olympus. Tóquio, Japão)
18 com lente polarizada Olympus® U-Pot (Olympus. Tóquio, Japão) e acoplado à
19 microcâmera Dinolite® (Am Mo Eletronics Corporation. New Taipei City 241, Taiwan)
20 em magnificação de 200X. As imagens foram analisadas no analisador de imagens
21 Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics. Rockville, MD) para obtenção da
22 percentagem da área de colágeno maduro e imaturo no osso. Foi considerado
23 colágeno do tipo I (colágeno maduro) aquele que apresentasse coloração vermelho-
24 alaranjada, enquanto o Colágeno do tipo III (imaturo) coloração verde-amarelada. O
25 osso adjacente ao lado distal da raiz foi escolhido para avaliação, pois durante o
26 movimento ortodôntico o osso é depositado na parede alveolar do lado de tração.

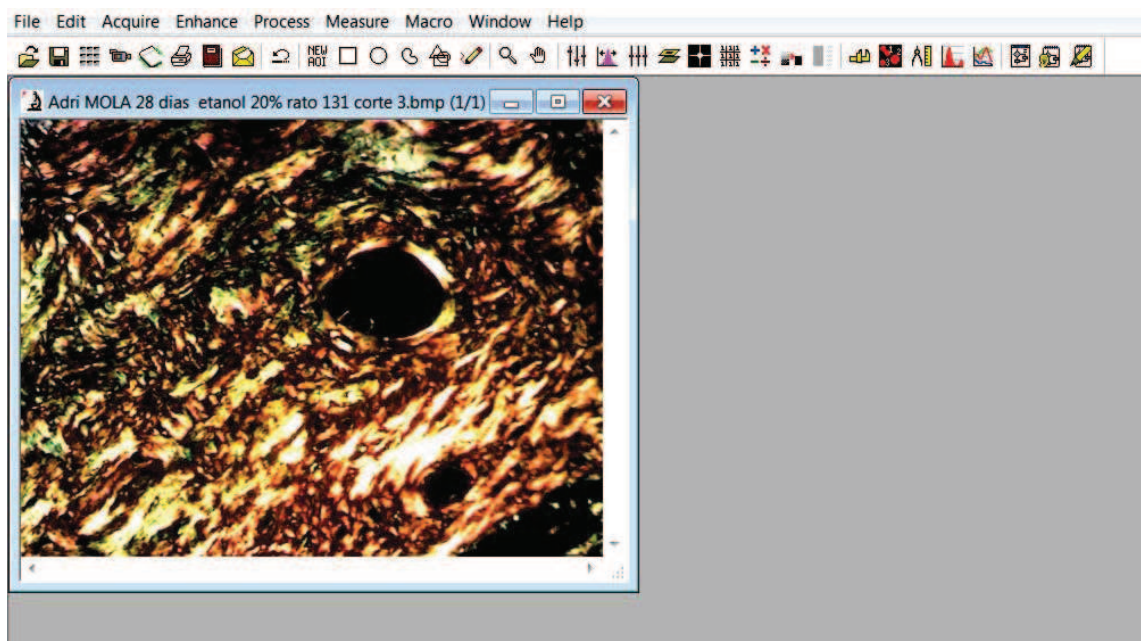


Fig 6. Imagem do programa Image-Pro Plus, no qual foi avaliada a porcentagem de colágeno do tipo I (colágeno maduro) com coloração vermelho-alaranjada, e o colágeno do tipo III (imaturo) com coloração verde-amarelada.

Taxa de deslocamento dentário

Para a avaliação da taxa de deslocamento dentário, foram realizadas moldagens dos arcos dentários superiores 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). A distância da face palatina do incisivo superior direito até a face mesial do primeiro molar superior direito foi medida com auxílio de paquímetro digital (Absolute-Mitutoyo. Kawasaki-Shi, Japan).



Fig 7. Fotografia do rato sendo moldado por silicone de condensação, para futura confecção do modelo de gesso que será medida para avaliar o deslocamento dentário.



Fig 8. Fotografia do molde do arco dentário superior do rato.



Fig 9. Fotografia do modelo de gesso e da distancia entre molar e incisivos sendo medida com auxilio do paquímetro digital.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa SPSS (versão 22.0; IBM SPSS, Armonk, NY). O nível de significância adotado em todos os testes estatísticos foi de 0.05.

Visando identificar se existia diferença estatisticamente significativa nos valores médios das variáveis: porcentagem de colágeno tipo I no osso alveolar e taxa de movimentação dentária e variação de massa corporal, segundo grupo e tempo, testou-se a normalidade dos dados utilizando o teste de Shapiro Wilk. Na sequência foi testada a homogeneidade das variâncias entre diferentes tratamentos usando 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 através 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 (*Power analysis*).

**ANEXO III- NORMAS PARA PUBLICAÇÃO - AMERICAN JOURNAL OF
ORTHODONTICS AND DENTOFACIAL ORTHOPEDICS**

Information for Authors

The American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics uses the Elsevier Editorial System (EES), an online manuscript submission and review system, To submit or review an article, please go to the AJO-DO EES website: <http://ees.elsevier.com/ajodo>,

Rolf G, Behrents, Editor-in-Chief

E-mail: behrents@slu.edu

Send other correspondence to:

Chris Burke, Managing Editor

American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics

University of Washington

Department of Orthodontics, D-569

HSC Box 357446

Seattle, WA 98195-7446

Telephone (206) 221-5413

E-mail: ckburke@aol.com

General Information

The American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics publishes original research, reviews, case reports, clinical material, and other material related to orthodontics and dentofacial orthopedics.

Submitted manuscripts must be original, written in English, and not published or under consideration elsewhere. Manuscripts will be reviewed by the editor and consultants and are subject to editorial revision, Authors should follow the guidelines below.

Statements and opinions expressed in the articles and communications herein are those of the author(s) and not necessarily those of the editor(s) or publisher, and the

editor(s) and publisher disclaim any responsibility or liability for such material. Neither the editor(s) nor the publisher guarantees, warrants, or endorses any product or service advertised in this publication; neither do they guarantee any claim made by the manufacturer of any product or service, Each reader must determine whether to act on the information in this publication, and neither the Journal nor its sponsoring organizations shall be liable for any injury due to the publication of erroneous information.

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see ➡ <http://www.elsevier.com/publishingethicsand> ➡ <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>,

Human and animal rights

If the work involves the use of animal or human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans ➡ <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments ➡ http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals ➡ <http://www.icmje.org>, Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

Guidelines for Original Articles

Submit Original Articles via EES: ➡ <http://ees.elsevier.com/ajodo>,

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.

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

5. *Tables*. Tables should be self-explanatory and should supplement, not duplicate, the text. Number them with Roman numerals, in the order they are mentioned in the

text, Provide a brief title for each, If a table has been previously published, include a footnote in the table giving full credit to the original source and include written permission for its use from the copyright holder, Submit tables as text-based files (Word is preferred, Excel is accepted) and not as graphic elements, Do not use colors, shading, boldface, or italic in tables, Do not submit tables as parts A and B; divide into 2 separate tables. Do not "protect" tables by making them "read-only." The table title should be put above the table and not as a cell in the table, Similarly, table footnotes should be under the table, not table cells.

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

7. *Copyright releas.* In accordance with the Copyright Act of 1976, which became effective February 1, 1978, all manuscripts must be accompanied by the following written statement, signed by all authors: *"The undersigned author(s) transfers all copyright ownership of the manuscript [insert title of article here] to the American Association of Orthodontists in the event the work is published. The undersigned author(s) warrants that the article is original, does not infringe upon any copyright or other proprietary right of any third party, is not under consideration by another journal, has not been previously published, and includes any product that may derive from the published journal, whether print or electronic media, I (we) sign for and accept responsibility for releasing this material,"* Scan the printed [copyright release](#) and submit it via EES.

8. *Use the International Committee of Medical Journal Editors Form for the Disclosure of Conflict of Interest (ICMJE Conflict of Interest Form).* If the manuscript is accepted, the disclosed information will be published with the article, The usual and customary listing of sources of support and institutional affiliations on the title page is proper and does not imply a conflict of interest, Guest editorials, Letters, and

Review articles may be rejected if a conflict of interest exists.

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

Checklist for Authors

- * Title page, including full name, academic degrees, and institutional affiliation and position of each author, and author to whom correspondence and reprint requests are to be sent, including address, business and home phone numbers, fax numbers, and e-mail address

- * Abstract

- * Article proper, including references and figure legends

- * Figures, in TIF or EPS format

- *Tables

- *[Copyright release statement](#), signed by all authors

- [Photographic consent statement\(s\)](#)

- * [ICMJE Conflict of interest statement](#)

- * Permissions to reproduce previously published material

Article structure

Introduction

Provide an adequate background so readers can understand the nature of the problem and its significance, State the objectives of the work, Cite literature selectively, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results,

Material and Methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced, If methods have already been published, indicate by a reference citation and describe only the relevant modifications, Include manufacturer information (company name and location) for any commercial product mentioned, Report your power analysis and ethics approval, as

appropriate,

Results

Results should be clear and concise,

Discussion

Explain your findings and explore their significance, Compare and contrast your results with other relevant studies, Mention the limitations of your study, and discuss the implications of the findings for future research and for clinical practice, Do not repeat information given in other parts of the manuscript,

Conclusions

Write a short Conclusions section that can stand alone, If possible, refer back to the goals or objectives of the research,

Essential title page information

- **Title**, Concise and informative, Titles are often used in information-retrieval systems, Avoid abbreviations and formulae where possible,
- **Author names and affiliation.**, Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled, Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names, Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address, Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author,
- **Corresponding author**, Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author**,
- **Present/permanent address**, If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name, The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address.