



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

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

CRISTIANO MIRANDA DE ARAUJO

**EFEITO DO ETANOL NO PADRÃO BINGE NA
MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA INDUZIDA EM RATOS
WISTAR**

**Curitiba
2013**

CRISTIANO MIRANDA DE ARAUJO, CD

**EFEITO DO ETANOL NO PADRÃO BINGE NA
MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA INDUZIDA EM RATOS
WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Ortodontia.

Orientador: Prof. Dr. Orlando Tanaka

CURITIBA

2013

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço de maneira especial ao Professor Doutor Orlando Tanaka, por sempre ter investido seu tempo e conhecimento em me ensinar e me orientar na ortodontia. Por ter sido não apenas um professor, e sim um mestre, que sempre se importou com meu aprendizado e orientação. Obrigado por todos ensinamentos ortodônticos e também de vida que me foi transmitido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Ele nada existiria. Toda minha caminhada até aqui foi por permissão de Deus que me deu todas as oportunidades para trilhar este caminho, a Ele toda minha gratidão.

A meu pai, Darci, que abdicou muitas vezes de seus próprios sonhos e interesses para investir em meus sonhos, por sempre ter acreditado no meu potencial mesmo que às vezes o sonho parecesse tão alto e distante. Ao senhor toda minha gratidão, amor e carinho, encontro em você um exemplo de humildade e caráter.

A minha madrasta, Luci, por sempre ter me tratado como “filho”, pelo cuidado e carinho dedicado a mim. Falo com toda certeza que você faz parte de todos meus objetivos e sonhos alcançados.

A minha mãe (*In Memoriam*), Adail, mesmo tendo vivido pouco tempo ao seu lado, levarei teu exemplo de pessoa dedicada, estudiosa e amorosa por toda a vida. Sua dedicação e amor pelos estudos me influenciaram a hoje estar seguindo esta caminhada acadêmica através do mestrado.

Aos meus irmãos, Alessandro, Sandro, Leandro, Juliano e Lucas, por sempre me fazerem sorrir e por se importarem comigo de uma forma especial.

A minha namorada, Bianca, por ser meu porto seguro, por ter me escutado nos momentos que eu estava a ponto de explodir, por sempre me incentivar a fazer o meu melhor e por sonhar junto comigo.

A Pontifícia Universidade Católica do Paraná, instituição que na graduação me acolheu e me deu a oportunidade de cursar o curso de Odontologia com bolsa integral, e também o Mestrado com bolsa integral. Esta instituição sempre será a minha segunda casa e a ela toda minha gratidão.

Ao Diretor do programa de pós-graduação em Odontologia, Professor Doutor Sérgio Vieira por exercer com maestria sua árdua função.

Ao Senhor Cândido José Thomaz Pereira e Rafael Zoez e demais funcionários do Biotério da PUCPR.

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

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

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

À professora Doutora Elisa Souza Camargo, por todos seus ensinamentos ortodônticos, por toda generosidade, elegância em suas atitudes e competência que sempre demonstrou a seus alunos. Obrigado por toda ajuda neste trabalho.

Ao Professor Doutor Odilon Guariza Filho, por sempre ter trazido consigo alegria, mesmo nos momentos mais difíceis do mestrado. Por todo seu ensinamento ortodôntico que nos foi transmitido.

À Professora Aline Cristina Batista Johann, por toda atenção e tempo destinados a realização deste trabalho. Agradeço às suas importantes considerações e contribuições.

Ao Professor Doutor Arno Locks, que aceitou gentilmente o convite para participar da minha banca de defesa. Agradeço por ter dedicado o seu precioso tempo para contribuir com esse trabalho.

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

Aos alunos do programa de iniciação científica, Amanda, Paola, Bianca e Cyro, obrigada por toda ajuda dispensada neste trabalho. Desejo a vocês todo sucesso em suas carreiras.

As funcionárias da clínica odontológica da PUCPR Nilce e Rosana por acompanharem os alunos da ortodontia com tanto zelo.

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

Agradeço a todos os meus colegas da 8ª Turma de Mestrado em Ortodontia da PUCPR, Bruno Borges de Castilhos, Jorge César Borges Leão Filho, José Guilherme Camargo Teixeira da Cunha, Regis Meller Santana, em especial aos que colaboraram de maneira direta com meu experimento: Ana Paula Lazzari Marques Peron, Viviane da Silva Kagy, Giovana Carla Franzon Frigotto, Luciana Trevisan Bittencourt Muniz, Marcel Durante Brunet, Camila Rychuv Santos, a todos vocês meu muito obrigado e para sempre minha gratidão.

SUMÁRIO

1.ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	1
Resumo.....	2
Introdução	3
Objetivo	4
Material e métodos	4
Resultados	9
Discussão	12
Conclusão	15
Referências	16
2. ANEXOS	19
Anexo I - Parecer do comitê de ética em pesquisa da PUCPR.....	19
Anexo II - Normas para publicação - American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics.....	20
3.ARTIGO EM INGLÊS	26
Abstract	27
Introduction.....	28
Material and methods	29
Results	33
Discussion	36
Conclusions	39
References	40

1 **ARTIGO EM PORTUGUÊS**
2 **PÁGINA TÍTULO**
3
4 **Efeito do Etanol no padrão binge sobre a movimentação dentária em ratos**
5 **Wistar**
6
7 **Cristiano Miranda de Araujo, CD**
8 Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil.
9 Escola de Saúde e Biociências
10 Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Ortodontia
11 Email: cristiano.m.araujo@hotmail.com
12
13 **Orlando Motohiro Tanaka, CD, PhD**
14 Professor, Programa de Pós-Graduação em Odontologia
15 Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil.
16 Escola de Saúde e Biociências
17 Email: tanakaom@gmail.com
18
19 **Autor correspondente**
20 **Orlando Motohiro Tanaka, CD, PhD**
21 Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil.
22 Escola de Saúde e Biociências
23 Rua Imaculada Conceição, 1155, Bairro Prado Velho,
24 CEP 80215-901 – Curitiba, PR
25 Email: tanakaom@gmail.com
26

RESUMO

Introdução: Objetivou-se avaliar as alterações teciduais decorrentes da administração de etanol a 10% e 20% no padrão binge, durante o movimento ortodôntico. **Métodos:** Foram utilizados ratos Wistar machos (n = 81), divididos em três grupos, grupo Controle (GC) foi administrado soro fisiológico a 0,9%, grupo Experimental I (GE I) foi realizado a administração de Etanol por via intraperitoneal, na concentração de 10% em soro fisiológico a 0,9%, no volume de 1,5 g/kg/dia, e grupo Experimental II (GE II), administrou-se etanol na concentração de 20% em soro fisiológico a 0,9%, no volume de 3 g/kg/dia. Foi aplicada uma força de 25 cN com uma mola fechada de níquel-titânio para mover o primeiro molar superior direito para mesial. Os grupos foram subdivididos em três subgrupos 2, 14 e 28 dias. Utilizou-se as colorações de fosfatase ácida-tartarato resistente, Picrosírius e Hematoxilina e Eosina, nas quais foram avaliados: reabsorção óssea, neoformação óssea e área hialina. Os dados foram comparados por ANOVA a dois critérios, Tukey HSD, Games-Howell e Teste de Qui-quadrado, ao nível de significância de 5%. **Resultados:** Verificou-se uma diminuição no número de osteoclastos no GE II ao dia 28, a percentagem de colágeno não demonstrou alteração na interação grupo x tempo, houve ao 14º dia maior presença de área hialina no grupo GE I. **Conclusões:** O consumo de etanol em um padrão binge no grupo GE II demonstrou uma diminuição no número de osteoclastos ao 28º dia. O grupo GE I demonstrou um aumento na área hialina comparado com os demais. Estas alterações demonstram que o etanol exerceu influência negativa sobre a movimentação dentária.

DESCRITORES (DeCS)

Etanol, Ortodontia, Binge

1 INTRODUÇÃO

2 O abuso de álcool afeta aproximadamente 14 milhões de norte-
3 americanos.¹ O etanol é o principal componente das bebidas alcoólicas, é
4 considerado tóxico para os órgãos vitais e até mesmo para os tecidos duros como
5 os ossos. O consumo crônico de álcool está associado a efeitos patológicos sobre
6 o osso, sendo prejudicial para a integridade deste tecido. O consumo excessivo de
7 etanol pode comprometer o processo de neoformação óssea, inibindo a atividade
8 dos osteoblastos, o que dificulta o processo de reparo após lesões ou cirurgias e
9 pode provocar alterações bioquímicas no tecido ósseo como a diminuição da
10 síntese de DNA e aceleração da apoptose osteoblástica com atividade normal dos
11 osteoclastos.^{2,3} O abuso da ingestão de álcool está associada com o aumento da
12 incidência de fraturas e complicações na cicatrização óssea.⁴⁻⁶

13 O consumo de álcool no padrão binge em humanos é caracterizado pelo
14 excessivo consumo em um curto espaço de tempo, em torno de cinco ou mais
15 doses em uma mesma ocasião para homens e quatro para mulheres.^{7,8} De acordo
16 com Callaci et al⁹ experimentalmente, o consumo de etanol no padrão binge pode
17 ser mimetizado pela administração de injeções de etanol em 3 a 4 dias na semana
18 seguido por dias sem a administração de álcool, estas são feitas pela via
19 intraperitoneal (IP) por ser bem tolerada pelos ratos e realizada com mínimo
20 estresse. Outra vantagem desta via é que se consegue alta concentração de
21 álcool no sangue em ambiente controlado, sendo uma via consistente e com
22 efeitos mínimos sobre o peso corporal dos ratos.

23 Soares et al² forneceram a ratos dieta líquida com etanol a 10%, durante 90
24 dias, e observaram menor volume ósseo em torno de implantes, indicando uma
25 alteração no metabolismo ósseo comparado ao grupo controle.

26 Callaci et al¹⁰ ao administrarem etanol 20% em ratos Wistar no padrão
27 binge, observaram diminuição na densidade mineral nas vértebras tanto na região
28 cortical quanto na região esponjosa e declínio da resistência à compressão,
29 também Lauing et al¹¹ observaram que o tratamento com etanol a 20%
30 demonstrou que regiões ósseas distintas reagem de maneira diferente, ou seja, as

1 vértebras lombares demonstraram ser mais resistentes que a tíbia. Callaci et al⁹
2 também observaram que a partir da terceira semana de aplicação de etanol a 20%
3 no padrão binge, fêmur e coluna lombar apresentaram densidade mineral óssea
4 significativamente diminuída.

5 A movimentação ortodôntica é caracterizada por reações sequenciais em
6 resposta às forças biomecânicas que induzem modificações teciduais no
7 periodonto, e estão relacionadas à remodelação por ativação da reabsorção óssea
8 alveolar no lado de pressão e consequente aposição óssea no lado de tração.¹²⁻¹⁴

9 O desequilíbrio entre o processo de formação e reabsorção óssea, provocada pelo
10 álcool, pode atuar de forma direta na reparação óssea.¹⁵ Ainda não há relatos na
11 literatura sobre a influência do etanol no movimento ortodôntico, por este motivo
12 justifica-se o presente estudo.

14 **OBJETIVO**

15 Avaliar as alterações teciduais ocorridas no ligamento periodontal e osso
16 alveolar adjacente às áreas mesial e distal do primeiro molar superior direito
17 decorrentes da administração de etanol a 10% e 20%, durante o movimento
18 ortodôntico induzido, quanto a reabsorção óssea, percentagem de colágeno tipo I
19 no osso alveolar e presença de áreas de hialinização.

21 **MATERIAL E MÉTODOS**

22 Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
23 da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), sob o número de registro
24 630. (Página 21 – ANEXO I)

25 Foram utilizados 81 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*
26 *albinus*) com 9 semanas de vida, pesando aproximadamente 300 – 350g,
27 fornecidos e mantidos pelo Biotério da PUCPR.

28 A temperatura foi controlada entre 19° e 22° e fotoperíodo de 12 horas claro
29 e 12 horas escuro. Foram fornecidos água e ração triturada *ad libitum*. Para

1 observar as alterações de peso, os animais foram pesados semanalmente, com o
2 auxílio de balança eletrônica de precisão (Gehaka – BG 4001, São Paulo, Brasil),
3 a variação do peso dos animais foi calculada através da fórmula:

$$\frac{(\text{Peso final} - 1) * 100}{\text{Peso inicial}}$$

6 Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos, divididos em
7 27 ratos por grupo: grupo Controle (GC), no qual foi administrado soro fisiológico a
8 0,9% em volume semelhante ao administrado no grupo experimental, grupo
9 Experimental I (GE I), foi realizado a administração de etanol na concentração de
10 10% (p/v) em soro fisiológico a 0,9%, no volume de 1,5 g/kg/dia, e grupo
11 Experimental II (GE II), foi realizada a administração de etanol na concentração de
12 20% (p/v) em soro fisiológico a 0,9%, no volume de 3 g/kg/dia.⁹ Estes grupos
13 foram subdivididos em 3 subgrupos 2, 14 e 28 dias. Esses subgrupos foram
14 constituídos com o número de 9 ratos, correspondendo ao dia da morte do animal,
15 após o início da aplicação da força ortodôntica, com a finalidade de caracterizar a
16 evolução do movimento dentário induzido ao longo do tempo.

17 A administração em todos os grupos teve início 30 dias antes da instalação
18 do dispositivo ortodôntico e prosseguiu até o momento da data da morte do
19 animal. Esta administração ocorreu por via intraperitoneal, e foi realizada
20 mimetizando o padrão binge de consumo, administrado quatro dias durante a
21 semana e três dias de abstinência.⁹

22 Em todos os animais foi utilizado um dispositivo ortodôntico para induzir a
23 movimentação dentária, este foi construído a partir do modelo utilizado por
24 Retamoso et al¹⁶, consistindo em uma mola fechada de níquel-titânio (G&H Wire®
25 - Franklin), fixada no primeiro molar superior direito e nos incisivos centrais,
26 produzindo força recíproca de 25cN.^{17,18} A mensuração da força produzida pela
27 mola foi padronizada com dinamômetro (Haag-Streit AG, Koeniz Switzerland,
28 Suíça), previamente calibrado. Após a ativação inicial, a mola não foi reativada
29 durante o período experimental, no entanto, seu posicionamento foi conferido
30 diariamente.

31 Os animais foram mortos por overdose de solução anestésica (Quetamina/
32 5,4ml/kg), via intraperitoneal. Em seguida a maxila de cada animal foi removida,

1 dissecada e seccionada na linha mediana. A hemimaxila direita foi fixada em
2 solução de formaldeído a 10% durante 24 horas para adequada fixação e após
3 dois meses de desmineralização, com solução de
4 etilenodiaminotetracetatodissodico (Biotec Reagentes Analíticos, Pinhais, Brasil) a
5 4,13%, foram processadas e emblocadas em parafina no Laboratório de Patologia
6 Experimental da PUCPR. Foram obtidas 15 secções transversais a partir do terço
7 cervical da raiz mésio-vestibular do primeiro molar superior, cortados em
8 micrótomo com 4µm de espessura, com a superfície oclusal do molar paralela ao
9 micrótomo e com intervalo de 60 µm entre cada secção.

10 As secções foram coradas pelas técnicas hematoxilina e eosina (HE),
11 picrossírius e fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP). Para cada técnica foram
12 utilizadas cinco secções.

13 A coloração histoquímica de *Picrossirius* consistiu em: após a
14 desparafinização em xilol, incubação em etanol e hidratação em água destilada,
15 as seções foram incubadas por 1 hora e uma solução de Sirius Red (Direct Red80,
16 diluído 0,19% em ácido pícrico saturado, Aldrich, Chemical Company, Milwaukee,
17 EUA) temperatura ambiente seguido por: lavagem em água destilizada,
18 contracoloração com Hematoxilina de Harris, desidratação em soluções
19 crescentes de álcool, diafanização em xilol e montagem em Entellan.

20 As secções coradas pela técnica TRAP, utilizou-se o kit TRAP Sigma 387A
21 (Sigma-Aldrich Chemicals, St. Louis, MO) seguindo as recomendações do
22 fabricante.

23 Os cortes para *Picrossirius* foram avaliados sob microscopia de luz, e foi
24 capturada uma imagem de cada corte, utilizando um microscópio Olympus BX-50
25 (Olympus, Tóquio, Japão) com lente polarizada Olympus® U-Pot (Olympus,
26 Tóquio, Japão) e acoplado a microcâmera Dinolite® (AmMo Eletronics Corporation,
27 New Taipei City 241, Taiwan) em magnificação de 100X. As imagens foram
28 analisadas no programa de morfometria Image Pro-Plus 4.5 (Media Cybernetics,
29 Rockville, MD) para obtenção da percentagem da área de colágeno maduro e
30 imaturo.¹⁶ Foi considerado Colágeno do tipo I (colágeno maduro) aquele que
31 apresentar coloração vermelho-alaranjada, enquanto o Colágeno do tipo III

(imaturo) foi verde-amarelado.¹⁹ O osso adjacente ao lado distal da raiz foi o escolhido para avaliação, pois durante o movimento ortodôntico o osso é depositado na parede alveolar do lado de tensão.¹⁶

Os cortes que foram corados pela técnica de coloração para fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP), foram realizados com o objetivo de avaliar a reabsorção óssea através da análise dos osteoclastos, a enzima TRAP (Fosfatase Ácida Tartarato-resistente) foi utilizada por ser considerada marcador pontual de osteoclastos e para determinar quantitativamente a reabsorção óssea. Desta forma, células TRAP-positivas, multinucleadas, no ligamento periodontal adjacente ao osso alveolar foram consideradas como osteoclastos funcionais e quantificadas.²⁰ Para tanto foram capturadas 5 imagens da região mesial da raiz, totalizando uma área de 942.813,00 μm^2 do ligamento periodontal, utilizando um microscópio Olympus BX-50 (Olympus, Tóquio, Japão) acoplado a microcâmera Dinolite® em magnificação de 400x.²¹ As imagens foram analisadas no programa de morfometria Image Pro-Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) no qual foi aplicado uma grade para contagem. Para a obtenção do número de osteoclastos, calculou-se a média das 5 secções.

A presença de áreas de hialinização foi avaliada na mesial da raiz mésio-vestibular em microscópio de luz Olympus BX – 40 (Olympus, Tóquio, Japão), com magnificação de 100x e coloração HE. As áreas de hialinização foram definidas como alterações degenerativas do LP, homogêneas e livres de células.^{22,23}

No presente estudo a avaliação do poder de reprodutibilidade para a análise quantitativa dos osteoclastos, o erro de Dalhberg encontrado foi menor que 1,8% indicando que o avaliador reproduziu as medidas de forma aceitável. Para a variável área de hialinização o coeficiente de concordância de Kappa o valor foi de 0,9180, sugerindo excelente concordância. Valores de Kappa maiores ou iguais a 0,00 e menores que 0,20 denotam concordância muito fraca; maiores ou iguais a 0,20 e menores que 0,40, concordância fraca; maiores ou iguais a 0,40 e menores que 0,60, concordância moderada; maiores ou iguais a 0,60 e menores que 0,80, concordância substancial e maiores ou iguais a 0,80 e menores que 1,0

1 concordância excelente.²⁴ Os resultados mostram que o avaliador reproduziu as
2 medidas de forma confiável.

3 A análise estatística foi realizada usando o programa SPSS (versão 16.0;
4 IBM SPSS, Armonk, NY). O nível de significância adotado foi de 0,05.

5 Para comparar os valores médios das variáveis dependentes: % de
6 colágeno tipo I no tecido ósseo, número de osteoclastos e presença ou ausência
7 de área hialina; segundo a inter-relação grupo x tempo, testou-se inicialmente a
8 normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias, entre os diferentes
9 tratamentos, utilizando os testes de normalidade de Shapiro - Wilk e o teste de
10 homogeneidade de variância de Levene.

11 Uma vez que os grupos apresentaram distribuição normal ($p > 0,05$), a
12 comparação dos valores médios segundo grupo e tempo foram realizadas
13 utilizando o teste paramétrico ANOVA a dois critérios (grupo e tempo), modelo
14 fatorial completo. Quando ANOVA indicou existir diferença e os tratamentos
15 apresentaram homogeneidade de variância a comparação dos tratamentos 2 a 2
16 foi feita através do teste paramétrico de comparações múltiplas de Tukey HSD
17 para variâncias homogêneas. Quando as variâncias se mostraram heterogêneas
18 utilizou-se o teste paramétrico de comparações múltiplas para variâncias
19 heterogêneas de Games-Howell.

20 Para a variável área de hialinização (com escala categórica dicotômica) a
21 análise de independência segundo grupo, tempo e interação grupo e tempo foi
22 realizada empregando o teste Qui-quadrado. Quando o teste Qui-quadrado
23 indicou existir diferença entre as variáveis, foi aplicado o teste de diferença entre
24 duas proporções visando identificar as variáveis que apresentavam diferença
25 estatisticamente significativa quando comparadas 2 a 2.

RESULTADOS

Reabsorção Óssea

Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na interação Grupo x Tempo. Observou-se diferença estatisticamente significativa no número de osteoclastos ao 28º dia do Grupo GE II comparado ao grupo GC (Tabela 1).

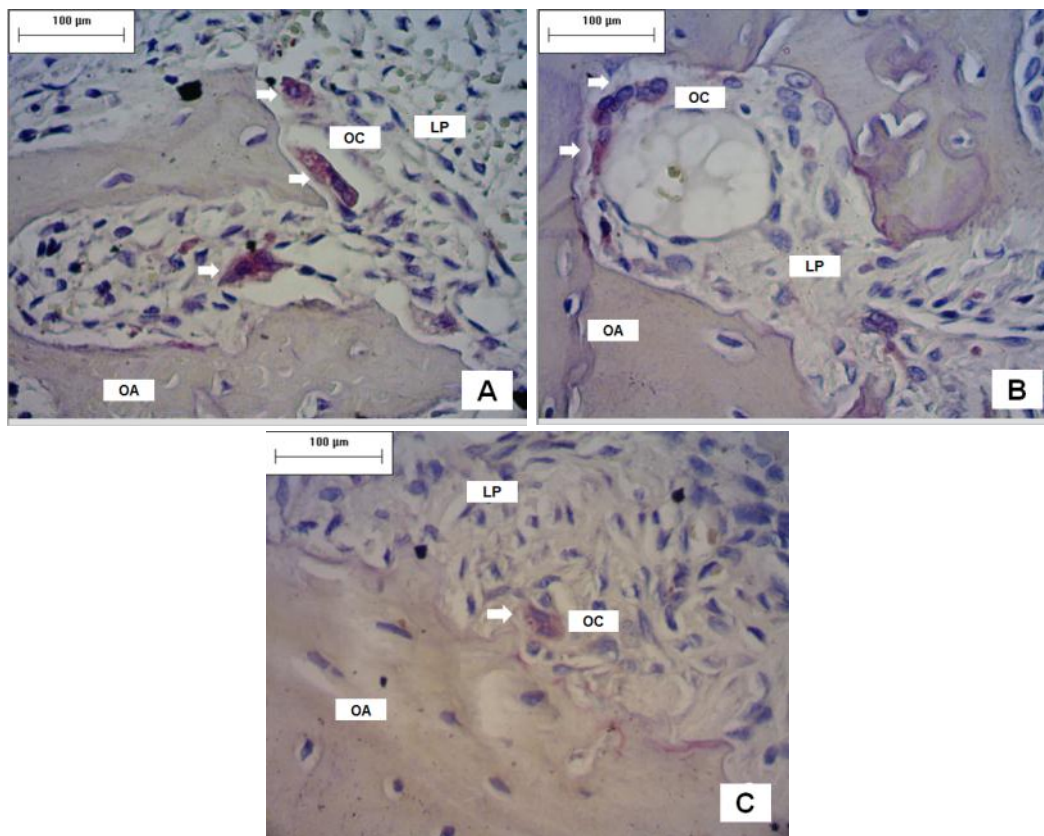


Figura 1 – Fotomicrografia de lâmina com coloração de TRAP, do grupo GC (A), GE I (B) e GE II (C), no 28º dia após instalação do dispositivo ortodôntico, sendo observado um menor número de osteoclastos no GE II no lado de pressão do ligamento periodontal da raiz mesial vestibular do primeiro molar superior direito. OA, osso alveolar; LP, ligamento periodontal, OC, osteoclastos, setas brancas indicando células TRAP positivas. (TRAP, magnificação 400x)

Neoformação Óssea

Quando avaliado a percentagem de colágeno tipo I não foi observado diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) avaliando a interação Grupo x Tempo. (Tabela 1)

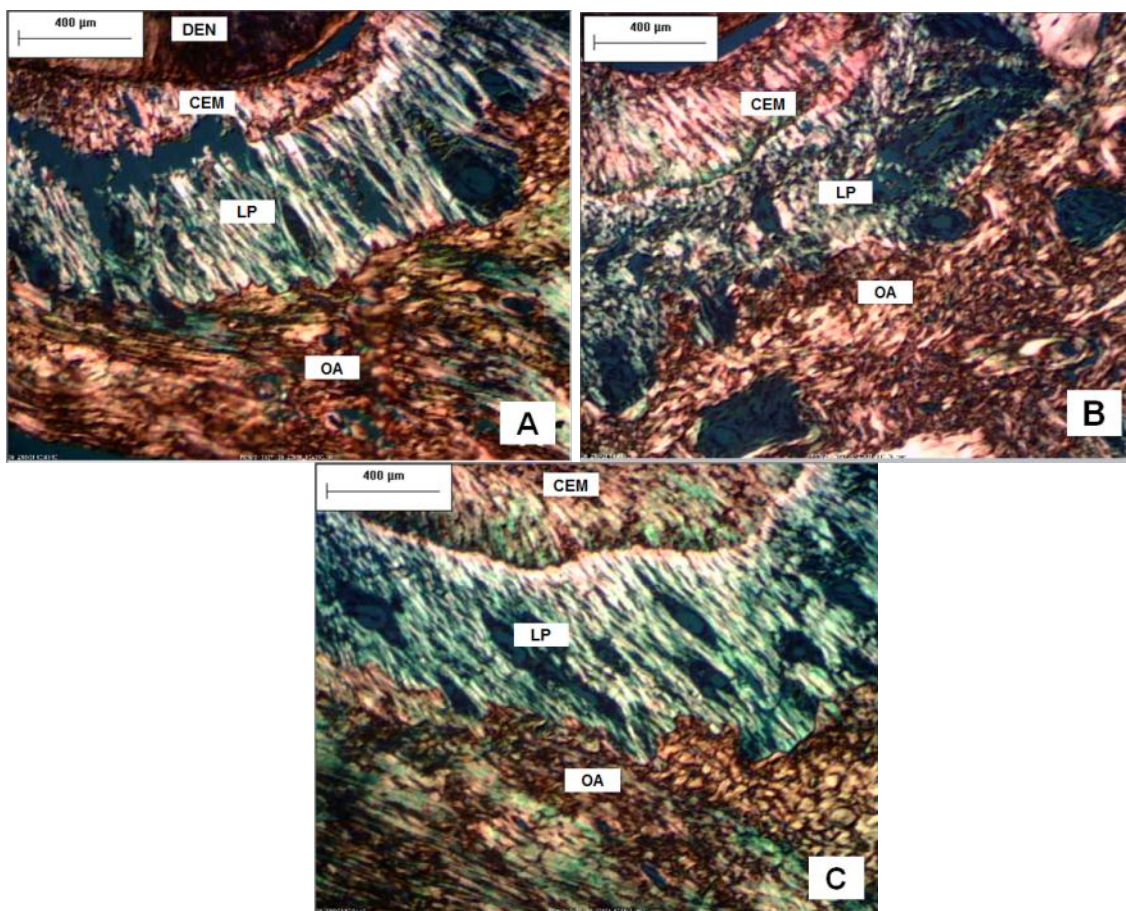


Figura 2 – Fotomicrografia de lâmina com coloração de Picrosírius do lado distal do ligamento periodontal da raiz mesial vestibular do primeiro molar superior direito, do grupo GC (A), GE I (B) e GE II (C), no 28º dia após instalação do dispositivo ortodôntico, não houve diferença estatisticamente significativa na interação grupo x tempo. DEN, dentina; CEM, cimento; LP, ligamento periodontal; OA, osso alveolar. (Picrosírius, magnificação de 100x)

Peso

Foi observada diferença estatisticamente significativa na interação Grupo x Tempo ($p < 0,05$). O GE II apresentou um menor peso comparado ao GC, sendo significativo apenas do dia 2 ($p < 0,05$). O GEI não apresentou diferenças com significância estatística comparando o GE II e o GC. (Tabela I)

Tabela I – Média e desvio padrão das variáveis: N° de osteoclastos, % de colágeno Tipo I, Variação de peso, nos grupos controle (GC), grupo experimental I (GE I) e grupo experimental II (GE II).

Grupo/Variáveis	Média ± DP			Comparações		
	GC	GE I	GE II	GC x GE I	GC x GE II	GE I x GE II
N° de Osteoclastos						
2 dias	1,7375 ± 2,05492	3,3571 ± ,66045	2,6286 ± 1,17716	,521	,972	,863
14 dias	4,7250 ± 3,24643	3,7143 ± 1,79576	3,8571 ± 2,36492	,996	,999	1,000
28 dias	7,0000 ± 3,92641	6,1857 ± 3,03942	2,1571 ± 1,72516	1,000	,013	,165
% Colágeno Tipo I						
2 dias	86,1425 ± 8,48060	81,2457 ± 13,46013	66,1814 ± 15,98788	,999	,180	,579
14 dias	78,5175 ± 17,67888	78,0242 ± 8,68141	70,1642 ± 18,78590	1,000	,969	,982
28 dias	85,7328 ± 9,10578	75,5385 ± 17,57683	75,8685 ± 15,21322	,920	,933	1,000
Variação de peso						
2 dias	15,7863 ± 4,25056	13,4671 ± 3,02566	6,0014 ± 5,31286	,989	,006	,102
14 dias	10,5050 ± 22,83129	13,6629 ± 1,97739	14,1914 ± 4,39931	,932	,852	1,000
28 dias	14,2486 ± 2,22475	6,8243 ± 2,05017	6,1529 ± 5,77777	,106	,056	1,000

Área Hialina

Houve diferença estatisticamente significativa ao 14º dia na interação Grupo x Tempo ($p < 0,05$), havendo presença de área hialina apenas no grupo GE I, não existindo nenhuma área hialina nos grupos GE II e GC. (Tabela II)

Tabela II – Frequência da variável área, nos grupos controle (GC), grupo experimental I (GE I) e grupo experimental II (GE II).

Variáveis	Frequência (%)			Comparações		
	GC	GE I	GE II	GC x GE I	GC x GE II	GE I x GE II
Área Hialina						
2 dias	50	28,6	42,9	0,2070	0,3938	0,2935
14 dias	0	42,9	0	0,0371	0,5000	0,0371
28 dias	0	0	0	0,5000	0,5000	0,5000

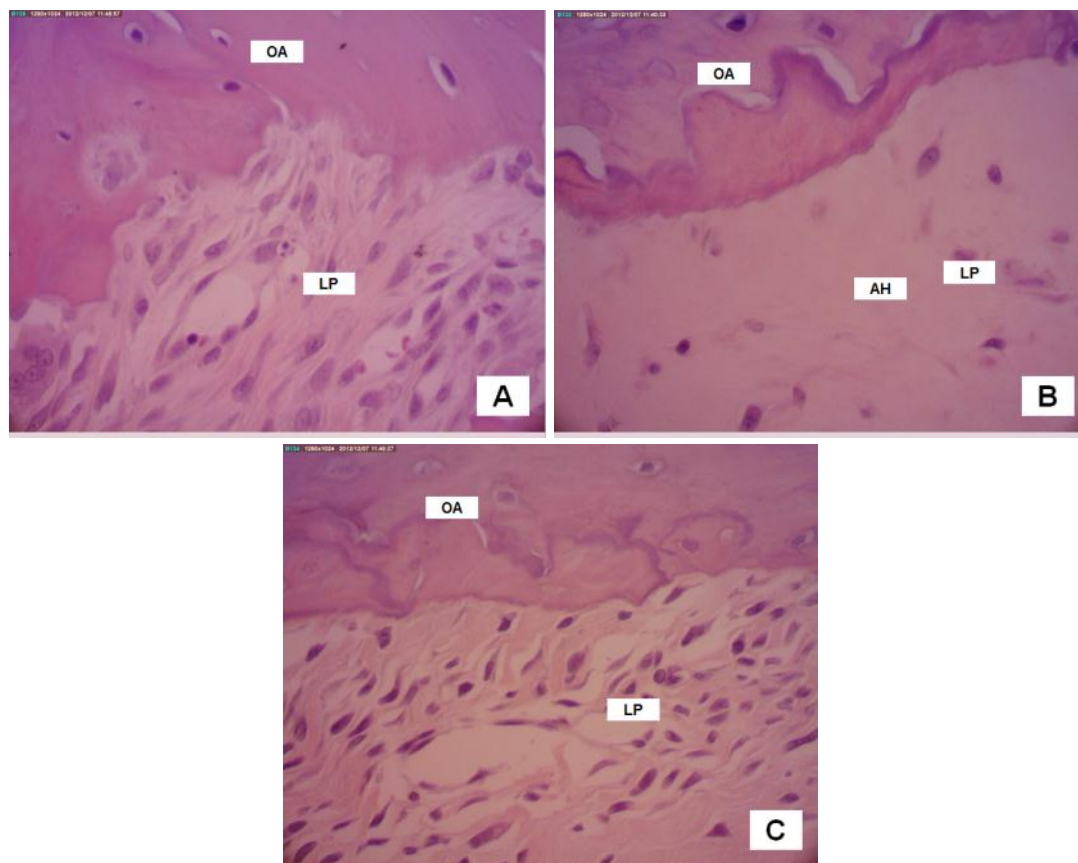


Figura 3 – Fotomicrografia de lâmina com coloração de Hematoxilina e Eosina do lado mesial do ligamento periodontal da raiz mesial vestibular do primeiro molar superior direito, do grupo GC (A), grupo GE I (B) e grupo GE II (C), ao 14º dia, observou-se maior presença de áreas de hialinização no grupo GE I. DEN,dente; AH, área de hialinização; LP, ligamento periodontal; OA, osso alveolar. (Hematoxilina e Eosina, magnificação 400x)

DISCUSSÃO

O uso de álcool durante a adolescência e idade adulta jovem é considerado um problema de saúde pública de destaque nos Estados Unidos.^{25,26} Entretanto, apesar da evidência de que uma proporção significativa da população de adolescentes e jovens tendem a consumir etanol em um padrão binge, a maioria dos estudos sobre os efeitos da ação do etanol no metabolismo ósseo utilizaram modelos de consumo crônico.¹¹ Frente a estes dados foi optado pela realização do trabalho no padrão de consumo binge, por ocorrer com maior prevalência de

consumo por adolescentes e estudantes universitários²⁶, sendo que pacientes nesta faixa etária, frequentemente, realizam tratamento ortodôntico.

Métodos diferentes variando as concentrações de etanol e o tempo de aplicação são relatados na literatura para avaliar os efeitos do etanol no tecido ósseo, e em seu processo de neoformação. Estudos sobre o efeito do etanol no tecido ósseo utilizaram concentrações que vão de 5% a 20% em períodos de 4 a 12 semanas.^{2,6,10,11,27} Na literatura científica ainda não há relato de trabalhos que fizeram a associação entre o efeito do etanol e o movimento dentário induzido, sendo assim foi escolhido às concentrações de 10% e 20% por já serem descritas suas alterações no processo de neoformação óssea.^{2,5,9-11}

O metabolismo ósseo, sob o efeito do etanol, não foi ainda completamente elucidado.^{5,11,15,28} O etanol pode promover um aumento na reabsorção óssea e na excreção de um marcador para reabsorção óssea, deoxipiridinolina (DPD), e também no número de osteoclastos.^{9,29,30} Estudo *in vitro* demonstrou aumento na atividade reabsortiva em osteoclastos expostos a diferentes concentrações de etanol.³¹ Contrastando com estes resultados, outro estudo demonstrou que o etanol pode não provocar alterações na osteoclastogênese.³² Para Klein³ o consumo habitual de etanol está claramente associado com a osteopenia, avaliações bioquímicas e histomorfométrica de indivíduos alcoólatras revelam um acentuado prejuízo na atividade osteoblástica com a atividade normal dos osteoclastos. No presente estudo, observou-se que no 28º dia, após ser instalado o dispositivo ortodôntico, houve a diminuição do número de osteoclastos no Grupo GE II ($p < 0,05$), comparado ao GC. Existem relatos na literatura que o etanol promove uma maior atividade reabsortiva, porém, nestes estudos o tempo máximo de aplicação utilizado foi de 4 semanas.⁹⁻¹¹ Preedy³³, ao avaliar a influência do etanol no osso por um tempo maior que 4 semanas, verificou um decréscimo de DPD na excreção urinária após a 6ª semana de consumo. Em concordância, em nosso estudo verificamos uma diminuição do número de osteoclastos após a 6ª semana, sendo estatisticamente significativa ao 28º dia. Estas alterações sugerem que o movimento do dente foi retardado por diminuição da reabsorção óssea e o tempo de aplicação do etanol pode influenciar na atividade osteoclástica.

1 Cerca de 90% da matriz orgânica do osso é composto por colágeno do tipo
2 I, durante o processo de reabsorção óssea este colágeno do tipo I é degradado, e
3 no processo de reparo fibras imaturas, compostas por colágeno tipo III, são
4 depositadas.^{20,34} Callaci et al⁹ ao avaliarem o efeito do etanol no metabolismo
5 ósseo observaram aumento na degradação do colágeno Tipo I no osso e um
6 decréscimo na densidade mineral óssea. Contudo, Maran et al²⁸ verificaram que
7 não houve redução no colágeno Tipo I. Em concordância com Maran, no presente
8 estudo também não se observou diferenças para a percentagem de colágeno tipo
9 I no osso alveolar ($p \geq 0,05$). Estes resultados podem sugerir que o etanol não
10 influenciou no processo de deposição de fibras colágenas.

11 No presente estudo observou-se que o GE I apresentou aos 14 dias maior
12 presença de área de hialinização, sendo estatisticamente significativa comparados
13 aos grupos GE II e GC. Sampson et al²⁷, em seu estudo utilizando uma menor
14 concentração de etanol, observou um aumento na densidade óssea no fêmur de
15 ratos Wistar. Em nosso estudo observou-se uma maior frequência de área de
16 hialinização no grupo GE I, uma hipótese para isto é que a administração de
17 etanol a 10% pode ter promovido um aumento na densidade mineral óssea.
18 Segundo von Bohl et al³⁵, a densidade mineral óssea e o metabolismo ósseo são
19 dois fatores que devem ser considerados quanto a presença de área de
20 hialinização, e este aumento pode ter gerado uma maior pressão no ligamento
21 periodontal, levando assim ao aumento na frequência de área de hialinização.

22 Na variável peso foi observada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) ao
23 2º dia, o grupo GE II apresentou maior variação de peso comparado ao GC.
24 Lauing et al¹¹ relatam que fatores como a saúde dos animais após a injeção
25 intraperitoneal, ingestão alimentar reduzida nos animais submetidos ao etanol e
26 um efeito direto do etanol na capacidade de ratos de transformar os nutrientes
27 absorvidos na dieta em massa corporal, podem ter influência direta na diferença
28 de ganho de peso entre o grupo controle e experimental. No presente estudo
29 houve diferença estatisticamente significativa quando administrado a concentração
30 de 20%, sugerindo que a variação de peso pode ser influenciada pela
31 concentração de etanol.

O efeito do etanol no processo de remodelação óssea, ainda é controverso, mas o ponto em comum é de que o etanol exerce influência no metabolismo ósseo. Diferenças na amostra como idade e tempo de uso de etanol podem ser uma das explicações para estas discrepâncias nos resultados, e não se pode delinear, conclusivamente, se é o aumento no processo de reabsorção ou a diminuição da neoformação óssea o principal mediador que induz a perda óssea provocada pelo etanol¹⁵, porém, constatou-se, no presente estudo, que o etanol promoveu desequilíbrio no processo de reabsorção óssea, e os efeitos devem ser considerados sob o ponto de vista ortodôntico, uma vez que a movimentação dentária é um processo ósseo-dependente.

Mais estudos devem ser realizados para identificar como o etanol exerce influência no processo de remodelação óssea, entretanto, no presente estudo foi observado que o etanol em uma concentração de 20% pode influenciar a movimentação dentária, levando a um retardo pela diminuição do número de osteoclastos quando uma força ortodôntica é aplicada. Resultados de pesquisa com animais não devem ser diretamente extrapolado para o que ocorre com humanos, contudo, deve-se ter cuidado quando uma força ortodôntica for aplicada em indivíduos que fazem o consumo de etanol em um padrão binge, pois este processo pode ser alterado, promovendo um retardo no processo de remodelação óssea e um possível aumento no tempo total de tratamento ortodôntico.

CONCLUSÃO

O etanol afeta o metabolismo ósseo, induzindo a diminuição no número de osteoclastos no 28º dia de aplicação de força ortodôntica. O etanol a 10% promoveu um aumento na frequência de área de hialinização ao 14º dia. Não se observou alterações significativas quanto à percentagem de colágeno tipo I. Estes resultados sugerem que o etanol afeta a movimentação dentária, e pode promover uma diminuição na taxa de movimentação.

REFERÊNCIAS

1. Grant BF, Dawson DA, Stinson FS, Chou SP, Dufour MC, Pickering RP. The 12-month prevalence and trends in DSM-IV alcohol abuse and dependence: United States, 1991-1992 and 2001-2002. *Drug Alcohol Depend* 2004;74:223-234.
2. Soares EV, Favaro WJ, Cagnon VH, Bertran CA, Camilli JA. Effects of alcohol and nicotine on the mechanical resistance of bone and bone neoformation around hydroxyapatite implants. *J Bone Miner Metab* 2010;28:101-107.
3. Klein RF. Alcohol-induced bone disease: impact of ethanol on osteoblast proliferation. *Alcohol Clin Exp Res* 1997;21:392-399.
4. Kanis JA, Johansson H, Johnell O, Oden A, De Laet C, Eisman JA et al. Alcohol intake as a risk factor for fracture. *Osteoporos Int* 2005;16:737-742.
5. Volkmer DL, Sears B, Lauing KL, Nauer RK, Roper PM, Yong S et al. Antioxidant therapy attenuates deficient bone fracture repair associated with binge alcohol exposure. *J Orthop Trauma* 2011;25:516-521.
6. Lima CC, Silva TD, Santos L, Nakagaki WR, Loyola YC, Resck MC et al. Effects of ethanol on the osteogenesis around porous hydroxyapatite implants. *Braz J Biol* 2011;71:115-119.
7. Wezeman FH, Juknelis D, Himes R, Callaci JJ. Vitamin D and ibandronate prevent cancellous bone loss associated with binge alcohol treatment in male rats. *Bone* 2007;41:639-645.
8. Wechsler H, Nelson TF. Binge drinking and the American college student: what's five drinks? *Psychol Addict Behav* 2001;15:287-291.
9. Callaci JJ, Juknelis D, Patwardhan A, Sartori M, Frost N, Wezeman FH. The effects of binge alcohol exposure on bone resorption and biomechanical and structural properties are offset by concurrent bisphosphonate treatment. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28:182-191.
10. Callaci JJ, Juknelis D, Patwardhan A, Wezeman FH. Binge alcohol treatment increases vertebral bone loss following ovariectomy: compensation by intermittent parathyroid hormone. *Alcohol Clin Exp Res* 2006;30:665-672.
11. Lauing K, Himes R, Rachwalski M, Strotman P, Callaci JJ. Binge alcohol treatment of adolescent rats followed by alcohol abstinence is associated with site-specific differences in bone loss and incomplete recovery of bone mass and strength. *Alcohol* 2008;42:649-656.
12. Macapanpan LC, Weinmann JP. The influence of injury to the periodontal membrane on the spread of gingival inflammation. *J Dent Res* 1954;33:263-272.

- 1 13. Heller IJ, Nanda R. Effect of metabolic alteration of periodontal fibers on
2 orthodontic tooth movement. An experimental study. Am J Orthod 1979;75:239-
3 258.
- 4 14. Hamaya M, Mizoguchi I, Sakakura Y, Yajima T, Abiko Y. Cell death of
5 osteocytes occurs in rat alveolar bone during experimental tooth movement. Calcif
6 Tissue Int 2002;70:117-126.
- 7 15. Dai J, Lin D, Zhang J, Habib P, Smith P, Murtha J et al. Chronic alcohol
8 ingestion induces osteoclastogenesis and bone loss through IL-6 in mice. J Clin
9 Invest 2000;106:887-895.
- 10 16. Retamoso L, Knop L, Shintcovsk R, Maciel JV, Machado MA, Tanaka O.
11 Influence of anti-inflammatory administration in collagen maturation process during
12 orthodontic tooth movement. Microsc Res Tech 2011;74:709-713.
- 13 17. Verna C, Dalstra M, Melsen B. The rate and the type of orthodontic tooth
14 movement is influenced by bone turnover in a rat model. Eur J Orthod
15 2000;22:343-352.
- 16 18. Drevensek M, Sproggar S, Boras I, Drevensek G. Effects of endothelin
17 antagonist tezosentan on orthodontic tooth movement in rats. Am J Orthod
18 Dentofacial Orthop 2006;129:555-558.
- 19 19. Borges LF, Gutierrez PS, Marana HR, Taboga SR. Picrosirius-polarization
20 staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in
21 vesical prolapse lesions. Micron 2007;38:580-583.
- 22 20. Marquezan M, Bolognese AM, Araujo MT. Effects of two low-intensity laser
23 therapy protocols on experimental tooth movement. Photomed Laser Surg
24 2010;28:757-762.
- 25 21. Braga SM, Taddei SR, Andrade I, Jr., Queiroz-Junior CM, Garlet GP, Repeke
26 CE et al. Effect of diabetes on orthodontic tooth movement in a mouse model. Eur
27 J Oral Sci 2011;119:7-14.
- 28 22. Tomizuka R, Shimizu Y, Kanetaka H, Suzuki A, Urayama S, Kikuchi M et al.
29 Histological evaluation of the effects of initially light and gradually increasing force
30 on orthodontic tooth movement. Angle Orthod 2007;77:410-416.
- 31 23. Miyoshi K, Igarashi K, Saeki S, Shinoda H, Mitani H. Tooth movement and
32 changes in periodontal tissue in response to orthodontic force in rats vary
33 depending on the time of day the force is applied. Eur J Orthod 2001;23:329-338.
- 34 24. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical
35 data. Biometrics 1977;33:159-174.

25. Naimi TS, Brewer RD, Mokdad A, Denny C, Serdula MK, Marks JS. Binge drinking among US adults. *JAMA* 2003;289:70-75.
26. Windle M. Alcohol use among adolescents and young adults. *Alcohol Res Health* 2003;27:79-85.
27. Sampson HW, Gallagher S, Lange J, Chondra W, Hogan HA. Binge drinking and bone metabolism in a young actively growing rat model. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:1228-1231.
28. Maran A, Zhang M, Spelsberg TC, Turner RT. The dose-response effects of ethanol on the human fetal osteoblastic cell line. *J Bone Miner Res* 2001;16:270-276.
29. Diez A, Puig J, Serrano S, Marinoso ML, Bosch J, Marrugat J et al. Alcohol-induced bone disease in the absence of severe chronic liver damage. *J Bone Miner Res* 1994;9:825-831.
30. Johnell O, Nilsson BE, Wiklund PE. Bone morphometry in alcoholics. *Clin Orthop Relat Res* 1982:253-258.
31. Cheung RC, Gray C, Boyde A, Jones SJ. Effects of ethanol on bone cells in vitro resulting in increased resorption. *Bone* 1995;16:143-147.
32. Crilly RG, Anderson C, Hogan D, Delaquerriere-Richardson L. Bone histomorphometry, bone mass, and related parameters in alcoholic males. *Calcif Tissue Int* 1988;43:269-276.
33. Preedy VR, Sherwood RA, Akpoguma CI, Black D. The urinary excretion of the collagen degradation markers pyridinoline and deoxypyridinoline in an experimental rat model of alcoholic bone disease. *Alcohol Alcohol* 1991;26:191-198.
34. Eriksen EF, Charles P, Melsen F, Mosekilde L, Risteli L, Risteli J. Serum markers of type I collagen formation and degradation in metabolic bone disease: correlation with bone histomorphometry. *J Bone Miner Res* 1993;8:127-132.
35. von Bohl M, Maltha JC, Von Den Hoff JW, Kuijpers-Jagtman AM. Focal hyalinization during experimental tooth movement in beagle dogs. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2004;125:615-623.

1 **2. ANEXOS**

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, 11 de agosto de 2011.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 630 – 1ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Efeito do etanol no movimento dentário induzido em ratos

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Cristiano Miranda de Araújo

EQUIPE DE PESQUISA:
Cristiano Miranda de Araújo

INSTITUIÇÃO:
Pontifícia Universidade Católica do Paraná

CENTRO / CURSO:
CCBS / Mestrado em Ortodontia

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
Ratos (<i>Ratus norvegicus</i>)	Machos	09 semanas 300-350g	B	90

O colegiado do CEUA em reunião no dia 11/08/2011, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando 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.



3

ANEXO II – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO – AMERICAN JOURNAL OF ORTHODONTICS AND DENTOFACIAL ORTHOPEDICS

Information for Authors

Electronic manuscript submission and review

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: ees.elsevier.com/ajodo*

Send other correspondence to:

Dr. Vincent G. Kokich, DDS, MSD, Editor-in-Chief

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: vgkokich@u.washington.edu

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

1 endorses any product or service advertised in this publication; neither do they
2 guarantee any claim made by the manufacturer of any product or service. Each
3 reader must determine whether to act on the information in this publication, and
4 neither the Journal nor its sponsoring organizations shall be liable for any injury
5 due to the publication of erroneous information.

7 **Guidelines for Original Articles**

8 Submit Original Articles via EES: ees.elsevier.com/ajodo.

9 Before you begin, please review the guidelines below. To view a 7-minute video
10 explaining how to prepare your article for submission, go to [Video on Manuscript](#)
11 [Preparation](#).

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

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

22 3. Manuscript. The manuscript proper should be organized in the following
23 sections: Introduction and literature review, Material and Methods, Results,
24 Discussion, Conclusions, References, and figure captions. Express measurements
25 in metric units, whenever practical. Refer to teeth by their full name or their FDI
26 tooth number. For style questions, refer to the AMA Manual of Style, 9th edition.
27 Cite references selectively, and number them in the order cited. Make sure that all
28 references have been mentioned in the text. Follow the format for references in
29 "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (Ann
30 Intern Med 1997;126:36-47); <http://www.icmje.org> . Include the list of references

1 with the manuscript proper. Submit figures and tables separately (see below); do
2 not embed figures in the word processing document.

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

13 5. *Tables.* Tables should be self-explanatory and should supplement, not
14 duplicate, the text. Number them with Roman numerals, in the order they are
15 mentioned in the text. Provide a brief title for each. If a table has been previously
16 published, include a footnote in the table giving full credit to the original source and
17 include written permission for its use from the copyright holder. Submit tables as
18 text-based files (Word or Excel, for example) and not as graphic elements.

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

25 7. *Copyright release.* In accordance with the Copyright Act of 1976, which
26 became effective February 1, 1978, all manuscripts must be accompanied by the
27 following written statement, signed by all authors:

28 "The undersigned author(s) transfers all copyright ownership of the
29 manuscript **[insert title of article here]** to the American Association of
30 Orthodontists in the event the work is published. The undersigned author(s)
31 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 College 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.

10. Systematic Reviews and Meta-Analyses must be accompanied by the current PRISMA checklist and flow diagram (go to Video on CONSORT and PRISMA). For complete instructions, see our Guidelines for Systematic Reviews and Meta-Analyses.

11. Randomized Clinical Trials must be accompanied by the current CONSORT statement, checklist, and flow diagram (go to Video on CONSORT and PRISMA). For complete instructions, see our Guidelines for Randomized Clinical Trials.

Other Articles

Follow the guidelines above, with the following exceptions, and submit via EES.

Case Reports will be evaluated for completeness and quality of records, quality of treatment, uniqueness of the case, and quality of the manuscript. A high quality manuscript must include the following sections: introduction; diagnosis; etiology;

1 treatment objectives, treatment alternatives, treatment progress, and treatment
2 results; and discussion. The submitted figures must include extraoral and intraoral
3 photographs and dental casts, panoramic radiographs, cephalometric radiographs,
4 and tracings from both pretreatment and posttreatment, and progress or retention
5 figures as appropriate. Complete Case Report Guidelines can be downloaded from
6 Case Report Guidelines.

7 Techno Bytes items report on emerging technological developments and
8 products for use by orthodontists.

10 **Miscellaneous Submissions**

11 Letters to the Editor and their responses appear in the Readers' Forum
12 section and are encouraged to stimulate healthy discourse between authors and
13 our readers. Letters to the Editor must refer to an article that was published within
14 the previous six (6) months and must be less than 500 words including references.
15 Send letters or questions directly to the editor, via e-mail:
16 vgkokich@u.washington.edu. Submit a signed copyright release with the letter.

17 Brief, substantiated commentary on subjects of interest to the orthodontic
18 profession is published occasionally as a Special Article. Submit Guest Editorials
19 and Special Articles via the Web site.

20 Books and monographs (domestic and foreign) will be reviewed, depending
21 upon their interest and value to subscribers. Send books to the Editor in Chief, Dr.
22 Vincent G. Kokich, Department of Orthodontics, University of Washington D-569,
23 HSC Box 357446, Seattle, WA 98195-7446. They will not be returned.

25 **Checklist for authors**

- 26 • Title page, including full name, academic degrees, and institutional affiliation
27 and position of each author, and author to whom correspondence and
28 reprint requests are to be sent, including address, business and home
29 phone numbers, fax numbers, and e-mail address
- 30 • Abstract
- 31 • Article proper, including references and figure legends

- 1 • *Figures, in TIF or EPS format*
- 2 • *Tables*
- 3 • *Copyright release statement, signed by all authors*
- 4 • *Photographic consent statement(s)*
- 5 • *ICMJE Conflict of interest statement*
- 6 • *Permissions to reproduce previously published material*
- 7

ARTIGO EM INGLÊS

TITLE PAGE

Effect of Ethanol on binge pattern of tooth movement in rats Wistars

Cristiano Miranda de Araujo, DDS

Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil.

School of Health and Biosciences

Graduate Program in Orthodontics

Email: cristiano.m.araujo@hotmail.com

Orlando Motohiro Tanaka, DDS, PhD

Professor, Graduate Program in Orthodontics

Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil.

School of Health and Biosciences

Email: tanakaom@gmail.com

Corresponding author

Orlando Motohiro Tanaka, DDS, PhD

Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil.

School of Health and Biosciences

Rua Imaculada Conceição, 1155, Bairro Prado Velho,

80215-901 – Curitiba, PR

Email: tanakaom@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: This study aimed to evaluate tissue changes following administration of binge-pattern ethanol exposure (10% and 20%) during orthodontic movement.

Methods: Male Wistar rats (n = 81) were divided into three groups; the control group (GC) received intraperitoneal 0.9% saline, the experimental group I (GE I) received 10% intraperitoneal ethanol in at 0.9% saline (1.5 g/kg/day) and Experimental group II (GE II) received 20% intraperitoneal ethanol in 0.9% saline (3 g/kg/day). A force of 25 cN was applied with a spring-closed nickel-titanium wire to move the upper right first molar mesially. The groups were further divided into three subgroups (2, 14 and 28 days). We labeled sections with tartrate-resistant acid phosphatase, picosirius and hematoxylin and eosin to evaluate bone resorption, bone formation and the hyaline area, respectively. The data were compared by two-way ANOVA, Tukey's HSD, Games-Howell and Chi-square test, and the significance level was set at 5%. **Results:** There was a decrease in the number of osteoclasts in GE II at day 28, the percentage of collagen showed no group x time interaction, and the largest hyaline area was observed on day 14 in GE I. **Conclusions:** Binge-pattern ethanol consumption in GE II decreased the number of osteoclasts at day 28. GE I showed an increase in hyaline area compared with the other groups.

KEYWORDS

Ethanol, Orthodontics, Binge

INTRODUCTION

Alcohol abuse affects approximately 14 million North Americans.¹ Ethanol is the main component of alcoholic beverages, is considered toxic to vital organs and can also affect hard tissues such as bones. Chronic alcohol consumption is associated with pathological effects on bone and reduced tissue integrity. Excessive ethanol consumption may affect the process of bone formation by inhibiting osteoblast activity, which complicates the process of repair after injury or surgery and may cause biochemical changes in bone tissue via a decrease in DNA synthesis and acceleration of osteoblast apoptosis despite normal osteoclast activity.^{2,3} Notably, alcohol abuse is associated with increased fracture incidence and bone healing complications.⁴⁻⁶

Binge-pattern alcohol consumption in humans is characterized by excessive consumption in a short time, with approximately five or more drinks on a single occasion for men and four for women.^{7,8} According to Callaci et al,⁹ experimental binge-pattern ethanol consumption can be mimicked by administering ethanol injections for 3 to 4 days per week followed by days where no alcohol is administered. Intraperitoneal (IP) injections are well tolerated by rats and cause minimal stress. Another advantage of this route is that it achieves a high concentration of blood alcohol in a controlled environment and has minimal effects on rat body weight.

Soares et al² supplied rats on a liquid diet with 10% ethanol for 90 days and observed low bone volume around implants, indicating a change in bone metabolism compared to controls.

Callaci et al¹⁰ administered 20% ethanol to rats using a binge pattern paradigm and observed decreased mineral density in the vertebrae in both the cortical and cancellous regions and decreased compressive strength. Similarly, Lauing et al¹¹ reported that treatment with 20% ethanol had varying effects on different bone regions, i.e., the lumbar vertebrae proved more resistant than the tibia. Callaci et al⁹ also observed that from the third week of 20% ethanol administered in a binge pattern, bone mineral density of the femur and lumbar spine decreased significantly.

Orthodontic movement is characterized by sequential reactions in response to biomechanical forces that induce changes in periodontal tissue and are related to remodeling by activation of alveolar bone resorption on the pressure side and consequent bone apposition on the traction side.¹²⁻¹⁴ Ethanol-induced imbalance between the processes of bone formation and resorption may directly affect bone repair.¹⁵ To date, there are no reports in the literature regarding the influence of ethanol in orthodontic movement.

Therefore, the objective of our study was to evaluate tissue changes occurring in the periodontal ligament and alveolar bone adjacent to the mesial and distal areas of the upper right first molar following administration of 10% or 20% ethanol and induced orthodontic movement. Specifically, we assessed bone resorption, the percentage of type I collagen in alveolar bone and the presence of hyalinization areas.

MATERIAL AND METHODS

This project was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA), of the University under the registration number 630 (Page 21).

We used 81 male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinos*) at 9 weeks old, weighing approximately 300-350 g that were supplied and maintained by Bioterium PUCPR.

The temperature was controlled between 19 °C and 22 °C and a 12/12-hour light/dark photoperiod. Rats were provided crushed food and water *ad libitum*. To observe changes in weight, the animals were weighed weekly, with the aid of electronic precision scale (Gehaka - BG 4001, São Paulo, Brazil), and weight changes were calculated using the following formula:

$$\frac{(\text{Final weight} - 1) * 100}{\text{Initial weight}}$$

The animals were randomly divided into three groups (27 rats per group): the Control group (GC) received 0.9% saline in a volume similar to that given to the experimental groups; Experimental group I (GE I) received 10% ethanol (w/v) in 0.9% saline (1.5 g/kg/day) and Experimental group II (GE II) received 20% ethanol

(w/v) in 0.9%, saline (3 g/kg/day).⁹ These groups were further subdivided into 3 subgroups (2, 14 and 28 days; n=9/group). These subgroups corresponded to the day of animal death after applying orthodontic force to characterize the evolution of tooth movement over time.

Ethanol administration began 30 days before orthodontic device installation and continued until sacrifice. This administration occurred intraperitoneally and was designed to mimic the pattern of binge drinking; ethanol was given 4 days during the week followed by three days of abstinence.⁹

The device used to induce orthodontic tooth movement was built from the model described by Retamoso et al¹⁶ and consisted of a spring closed nickel-titanium wire (G&H® Wire - Franklin, Indiana, USA) that was attached to the upper right first molar and central incisors of all animals, producing a 25-cN reciprocal force.^{17,18} The measurement of the force produced by the spring was standardized with a calibrated dynamometer (Haag-Streit AG, Switzerland Koeniz, Switzerland). After the initial activation, the springs were not reactivated during the experimental period; however, their position was checked daily.

The animals were sacrificed with an intraperitoneal overdose of anesthetic (5.4 ml/kg ketamine). Then, the jaw of each animal was removed, dissected and sectioned at the midline. The right hemimaxilla was fixed in 10% formaldehyde solution for 24 hours for proper fixation, and after two months of demineralization, it was further fixed with 4.13% Ethylenediamine tetraacetic acid solution (Biotec Analytical Reagents, Pinhais, Brazil), processed and embedded in paraffin at the Laboratory of Experimental Pathology PUCPR. We obtained 15 cross sections from the cervical third of the mesio-vestibular root of the maxillary first molar, that were cut with a microtome at 4 µm, with the occlusal surface of the molar parallel to microtome and 60-µm intervals between each section.

The sections were stained with hematoxylin and eosin (HE), picrosirius and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP). Five sections were used for each technique.

Picrosirius staining was performed as follows. After deparaffinization in xylene, sections were hydrated in ethanol, rinsed in distilled water, incubated for 1

1 hour in a solution of Sirius Red (Direct RED80, diluted to 0.19% in saturated picric
2 acid, Aldrich Chemical Company, Milwaukee, USA) at an ambient temperature
3 followed by washing with distilled water, counterstaining with Harris hematoxylin,
4 dehydrating in increasing alcohol solutions, deparaffinizing in xylene and mounting
5 in Entellan.

6 For the TRAP technique, we used the kit TRAP Sigma 387A (Sigma-Aldrich
7 Chemicals, St. Louis, MO) following the manufacturer's recommendations.

8 Picrosirius-treated sections were evaluated under light microscopy, and
9 images were captured using an Olympus microscope BX-50 (Olympus, Tokyo,
10 Japan) equipped with a polarized lens Olympus U-Pot ® (Olympus, Tokyo, Japan)
11 and coupled to a Dino-Lite® microcamera (AmMo Electronics Corporation, New
12 Taipei City, Taiwan) at a magnification of 100X. The images were analyzed with
13 the morphometry program Image Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, MD)
14 to obtain the percentage of the areas of immature and mature collagen.¹⁶ Type I
15 Collagen (mature) appeared red-orange, while type III collagen (immature) was
16 yellowish-green.¹⁹ The bone adjacent to the distal side of the root was chosen for
17 evaluation because bone is deposited in the alveolar wall tension side during
18 orthodontic movement.¹⁶

19 The TRAP-stained sections were used to identify osteoclasts and
20 quantitatively determine bone resorption. Thus, TRAP-positive multinucleated cells
21 in the periodontal ligament adjacent to the alveolar bone were considered
22 functional osteoclasts and quantified.²⁰ For each section, we captured 5 images of
23 the mesial region of the root totaling an area of 942,813.00 µm² of the periodontal
24 ligament using an Olympus microscope BX-50 (Olympus, Tokyo, Japan) coupled
25 to a micro Dino-Lite ® at 400x magnification.²¹ The images were analyzed with
26 Image Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) using a counting grid.
27 We calculated the mean of five sections to obtain the average number of
28 osteoclasts.

29 Hyalinization areas were evaluated in the mesial region of the mesio-
30 vestibular root under an Olympus BX - 40 light microscope (Olympus, Tokyo,
31 Japan) with a magnification of 100x under HE staining. These areas were

1 characterized by degenerative changes of the LP that were homogeneous and cell-
2 free.^{22,23}

3 The evaluation of power reproducibility for quantitative osteoclast analysis,
4 revealed a Dalhberg error less than 1.8%, indicating that the estimate of random
5 error is reliable. For the variable area of hyalinization, the concordance coefficient
6 kappa value was 0,9180, suggesting excellent agreement.²⁴ The results show that
7 the evaluator reproduced reliable measures.

8 Statistical analysis was performed using SPSS (version 16.0, SPSS IBM,
9 Armonk, NY). The significance level for all tests was 0.05.

10 The following criteria were used to compare the mean values of the
11 dependent variables: % of type I collagen in bone tissue, number of osteoclasts,
12 and the presence or absence of hyaline area according to the interrelationship
13 group x time. Additionally, we initially tested the data for normal distributions and
14 homogeneity of variances among the different treatments with Shapiro-Wilk's test
15 and Levene's test, respectively.

16 For groups that showed normal distribution ($p > 0.05$), the mean values were
17 performed using two-way ANOVA (group and time), full factorial design. When
18 ANOVA indicated that there were differences and when treatments exhibited
19 homogeneity of variance, we performed Tukey's HSD for multiple comparisons.
20 For heterogeneous variances, we employed Games-Howell multiple comparisons
21 tests.

22 To investigate differences in hyalinization (with a dichotomous categorical
23 scale), we assessed time and group interaction, with time evaluated using a chi-
24 square test. When the chi-square test indicated a difference between the variables,
25 we applied the test of difference between two proportions to identify the variables
26 that were significantly different when compared 2 x 2.

RESULTS

Bone Resorption

There was a statistically significant difference ($p < 0.05$) regarding the number of osteoclasts in the Group x Time interaction when the GE II and control groups were compared on day 28 (Table 1).

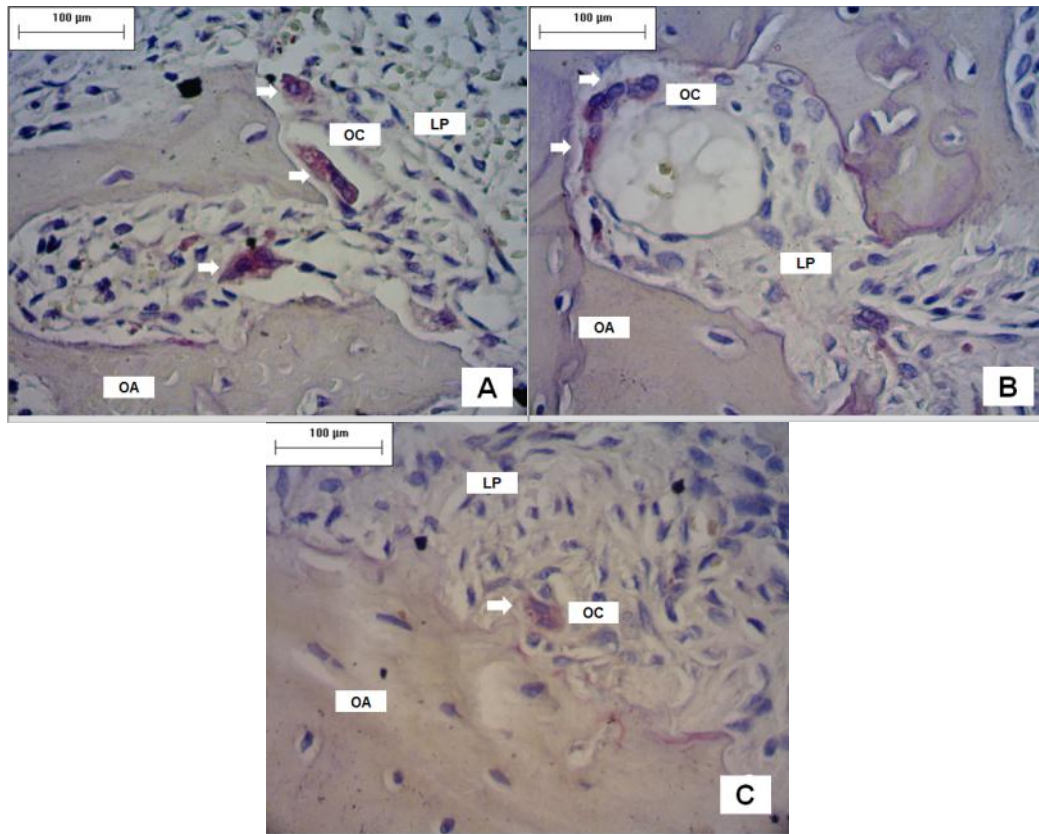


Figure 1 – Photomicrograph of blade stained with TRAP, group GC (A), GE I (B) and GE II (C) on the 28th day after orthodontic appliance installation. Fewer osteoclasts were observed in GE II on the pressure side of the periodontal ligament of the mesial vestibular root of the maxillary right first molar. OA, alveolar bone, LP, periodontal ligament, OC, osteoclasts, white arrows indicate TRAP-positive cells (TRAP, magnification 400x).

Bone neoformation

When evaluated, the percentage of type I collagen was not observed to be statistically significant difference ($p > 0.05$) based on an evaluation of the Group x Time interaction. (Table 1)

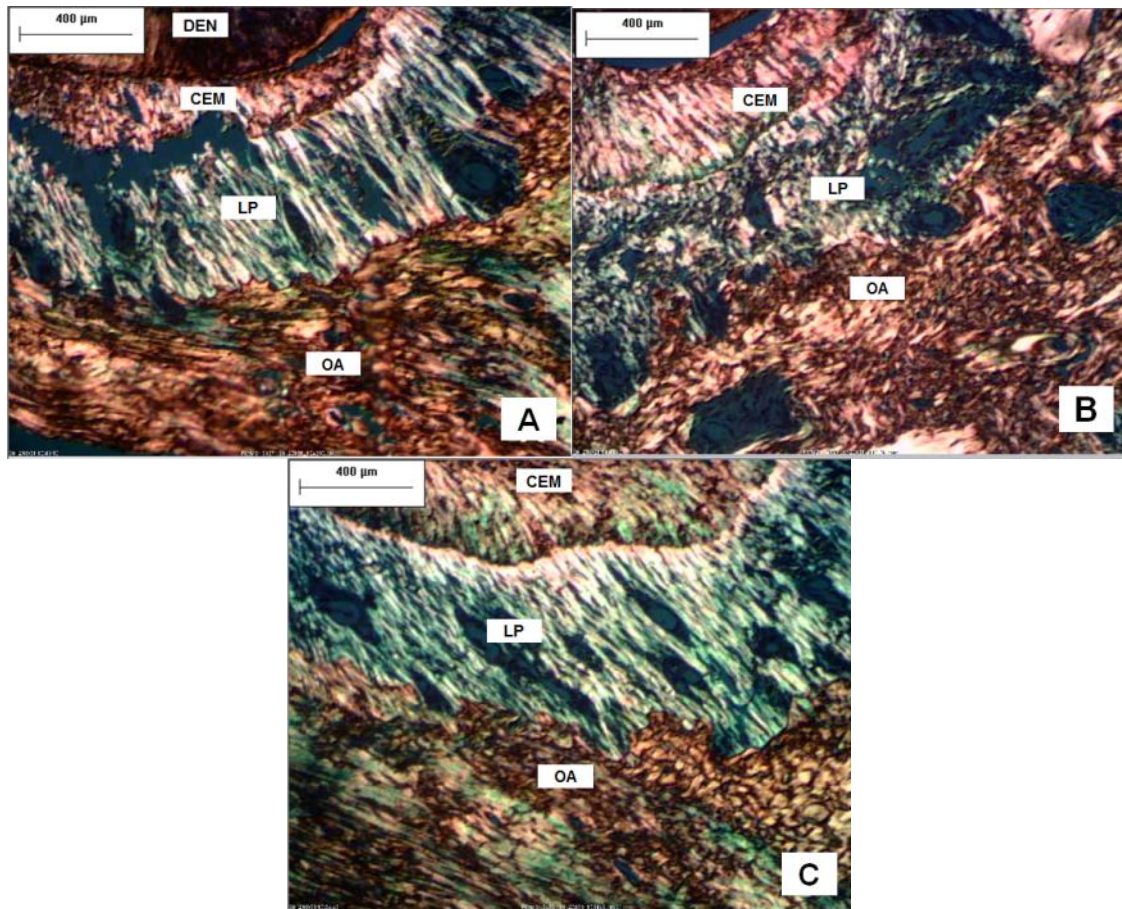


Figure 2 – Photomicrograph of blade stained with Picrosirius of the distal side of the periodontal ligament of the mesial vestibular root first molar upper right of the control group (A), GE I (B) and GE II (C), in the 28th day after installation of orthodontic appliance, there was no statistically significant difference in the group x time interaction. DEN, dentin, CEM, cementum, LP, periodontal ligament, OA, alveolar bone. (Picrosirius, magnification 100x)

Weight

We found statistically significant difference in GE II to GC on day 2 ($p < 0.05$), but GE I was not significantly different from GE II or GC (Table I).

Table I – Mean and standard deviation of variables: Number of osteoclasts, % Type I collagen and weight change in the control group (GC), experimental group I (GE I) and experimental group II (GE II).

Groups/Variables	Mean $\pm$ SD			Comparisons		
	GC	GE I	GE II	GC x GE I	GC x GE II	GE I x GE II
N° of Osteoclasts						
2 days	1.7375 $\pm$ 2.05492	3.3571 $\pm$.66045	2.6286 $\pm$ 1.17716	0.521	0.971	0.862
14 days	4.7250 $\pm$ 3.24643	3.7143 $\pm$ 1.79576	3.8571 $\pm$ 2.36492	0.996	0.999	0.999
28 days	7.0000 $\pm$ 3.92641	6.1857 $\pm$ 3.03942	2.1571 $\pm$ 1.72516	0.999	0.012	0.164
% Type I Collagen						
2 days	86.1425 $\pm$ 8.48060	81.2457 $\pm$ 13.4601	66.1814 $\pm$ 15.9878	0.999	0.179	0.579
14 days	78.5175 $\pm$ 17.6788	78.0242 $\pm$ 8.68141	70.1642 $\pm$ 18.7859	0.999	0.968	0.982
28 days	85.7328 $\pm$ 9.10578	75.5385 $\pm$ 17.5768	75.8685 $\pm$ 15.2132	0.919	0.932	0.999
Weight variation						
2 days	15.7863 $\pm$ 4.25056	13.4671 $\pm$ 3.02566	6.0014 $\pm$ 5.31286	0.989	0.005	0.102
14 days	10.5050 $\pm$ 22.8312	13.6629 $\pm$ 1.97739	14.1914 $\pm$ 4.39931	0.932	0.852	0.999
28 days	14.2486 $\pm$ 2.22475	6.8243 $\pm$ 2.05017	6.1529 $\pm$ 5.77777	0.106	0.055	0.999

Hyaline area

We observed a statistically significant difference at the 14th day in the Group x Time interaction ($p < 0.05$), with the presence of a hyaline area just in the GE I group, and no hyaline area in the GE II and GC groups (Table II).

Table II – Frequency of the variable for area in the control group (GC), experimental group I (GE I) and experimental group II (GE II).

Variables	Frequency (%)			Comparisons		
	GC	GE I	GE II	GC x GE I	GC x GE II	GE I x GE II
Hyaline area						
2 days	50	28.6	42.9	0.207	0.393	0.293
14 days	0	42.9	0	0.037	0.5	0.037
28 days	0	0	0	0.5	0.5	0.5

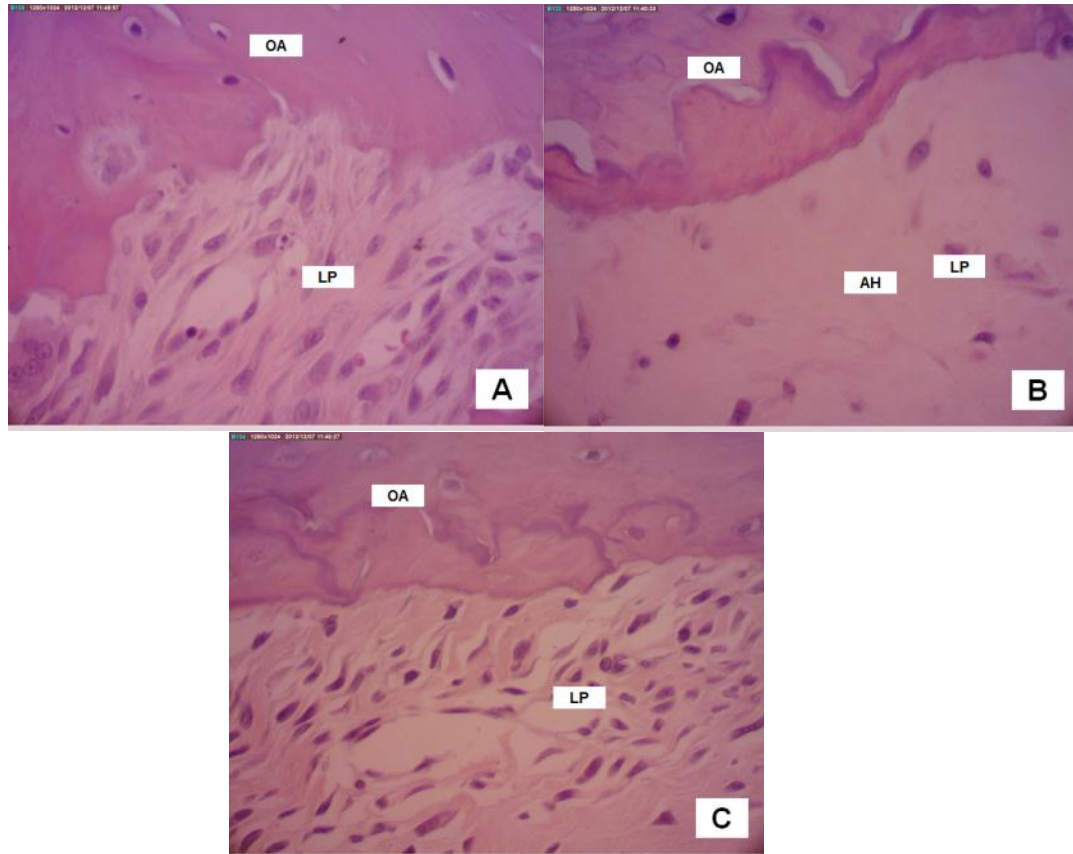


Figure 3 – Photomicrograph of blade stained with hematoxylin and eosin on the mesial side of the periodontal ligament of the mesial vestibular root first molar upper right of the control group (A), GE I group (B) and GE II (C). More hyalinization areas were observed on the 14th day in GE group I. DEN, tooth, AH, area hyalinization, LP, periodontal ligament, OA, alveolar bone (magnification 400x).

DISCUSSION

Alcohol use during adolescence and young adulthood is considered an important public health problem in the United States.^{25,26} However, despite evidence that a significant proportion of adolescents and young people tend to binge drink ethanol, most studies on the effects of ethanol action on bone metabolism use chronic consumption models.¹¹ Based on these data, we decided to employ a binge pattern, which is a more common pattern of alcohol use by teenagers and college students²⁶, and patients in this age group often undergo orthodontic treatment.

1 Methods described in the literature employ varying concentrations of ethanol
2 and different application times to evaluate the effects of ethanol. Studies on the
3 effects of ethanol on bone tissue use concentrations ranging from 5% to 20% for
4 periods of 4 to 12 weeks.^{2,6,10,11,27} There are no reports of association studies
5 assessing ethanol and tooth movement, so we used two concentrations of ethanol
6 (10% and 20%) to assess the effects of osteogenesis.^{2,5,9-11}

7 The effect of ethanol on bone metabolism has not been fully
8 elucidated.^{5,11,15,28} Ethanol can promote an increase in bone resorption and
9 excretion of deoxypyridinoline (DPD), a marker for bone resorption; it can also
10 affect osteoclasts.^{9,29,30} An *in vitro* study showed increased resorption in
11 osteoclasts exposed to different concentrations of ethanol.³¹ Contrasting with these
12 results, another study demonstrated that ethanol does not cause changes in
13 osteoclastogenesis.³² Results published by Klein³ showed that habitual ethanol
14 consumption is clearly associated with osteopenia, and histomorphometric and
15 biochemical evaluations of alcoholic patients showed a marked impairment in
16 osteoblastic activity with normal osteoclast activity. In the present study, we
17 observed that on the 28th day after the orthodontic appliance was installed, there
18 was a decrease in the number of osteoclasts in the GE II group ($p < 0.05$)
19 compared to GC. There are reports that ethanol promotes increased resorptive
20 activity; however, the maximum time of application in these studies was 4 weeks.⁹⁻
21 ¹¹ Preedy³³ employed a longer ethanol paradigm and observed a decrease in
22 urinary DPD excretion after 6 weeks of consumption. Accordingly, we observed a
23 decrease in the number of osteoclasts after 6 weeks of ethanol administration,
24 which was statistically significant at day 28. These changes suggest that tooth
25 movement is delayed by decreased bone resorption, and ethanol may influence
26 osteoclast activity over time.

27 Approximately 90% of the organic matrix of bone consists of type I collagen,
28 which is degraded during bone resorption and replaced by immature fibers
29 composed of collagen type III.^{20,34} Callaci et al⁹ evaluated the effect of ethanol on
30 bone metabolism and observed an increase in type I collagen degradation in bone
31 and a corresponding decrease in bone mineral density. However, Maran et al²⁸

1 found that there was no reduction in collagen type I. Similarly, we did not observe
2 differences in the percentage of type I collagen in alveolar bone ($p \geq 0.05$). These
3 results suggest that ethanol does not influence the process of collagen deposition.

4 We found that the hyalinization area increased in GE I by 14 days, which
5 was statistically significant compared to the GE II and GC groups. Sampson et al²⁷
6 used a lower concentration of ethanol and reported increased bone density in the
7 femur of Wistar rats. In our study, we observed larger hyalinization areas in GE I.
8 One hypothesis for this finding is that the administration of 10% ethanol may have
9 promoted increased bone mineral density. According to von Bohl et al³⁵, bone
10 mineral density and bone metabolism are two factors that should be considered to
11 influence the presence of hyalinization area, and this increase may have generated
12 greater pressure on the periodontal ligament, thus leading to an increase in the
13 area of hyalinization.

14 We observed statistically significant differences in weight ($p < 0.05$) at day 2;
15 the GE II group showed greater weight variation compared to GC. Lauing et al¹¹
16 reported that factors such as animal health after intraperitoneal injection reduced
17 food intake in animals treated with ethanol and noted the direct effect of ethanol on
18 the ability of rats to transform dietary nutrients into body weight. These variables
19 may have directly influenced the difference in weight gain between the control and
20 experimental group. We only observed a statistically significant difference in the
21 group that received 20% ethanol, suggesting that weight variation can be
22 influenced by ethanol concentration.

23 The effect of ethanol on bone remodeling is still controversial, but the
24 common hypothesis is that ethanol affects bone metabolism. Differences in the
25 variables, such as age and time course of ethanol use, may be one explanation for
26 discrepant results. In addition, it is difficult to ascribe differences to changes in
27 resorption or decreased bone formation, the main mediator of ethanol-induced
28 bone loss¹⁵. However, we found that ethanol promoted an imbalance in bone
29 resorption, and the effects must be considered from an orthodontic viewpoint
30 because tooth movement is a bone-dependent process.

1 More studies should be performed to determine how ethanol affects bone
2 remodeling. Here, we show that 20% ethanol can influence tooth movement when
3 an orthodontic force is applied; specifically, it causes a delay by decreasing the
4 number of osteoclasts. The results of animal research should not be directly
5 extrapolated to humans; however, caution should be taken when applying an
6 orthodontic force to individuals who binge drink ethanol, as this substance can
7 promote a delay in bone remodeling processes and may possibly increase the total
8 time of orthodontic treatment.

9 **CONCLUSIONS**

10 Ethanol affects bone metabolism and induced a decrease in the number of
11 osteoclasts on the 28th day of orthodontic force application. Administration of 10%
12 ethanol promoted an increase in the frequency area of hyalinization to day 14.
13 There were no significant changes in the percentage of collagen type I. These
14 results suggest that ethanol may decrease the rate of tooth movement.

15

REFERENCES

1. Grant BF, Dawson DA, Stinson FS, Chou SP, Dufour MC, Pickering RP. The 12-month prevalence and trends in DSM-IV alcohol abuse and dependence: United States, 1991-1992 and 2001-2002. *Drug Alcohol Depend* 2004;74:223-234.
2. Soares EV, Favaro WJ, Cagnon VH, Bertran CA, Camilli JA. Effects of alcohol and nicotine on the mechanical resistance of bone and bone neoformation around hydroxyapatite implants. *J Bone Miner Metab* 2010;28:101-107.
3. Klein RF. Alcohol-induced bone disease: impact of ethanol on osteoblast proliferation. *Alcohol Clin Exp Res* 1997;21:392-399.
4. Kanis JA, Johansson H, Johnell O, Oden A, De Laet C, Eisman JA et al. Alcohol intake as a risk factor for fracture. *Osteoporos Int* 2005;16:737-742.
5. Volkmer DL, Sears B, Lauing KL, Nauer RK, Roper PM, Yong S et al. Antioxidant therapy attenuates deficient bone fracture repair associated with binge alcohol exposure. *J Orthop Trauma* 2011;25:516-521.
6. Lima CC, Silva TD, Santos L, Nakagaki WR, Loyola YC, Resck MC et al. Effects of ethanol on the osteogenesis around porous hydroxyapatite implants. *Braz J Biol* 2011;71:115-119.
7. Wezeman FH, Juknelis D, Himes R, Callaci JJ. Vitamin D and ibandronate prevent cancellous bone loss associated with binge alcohol treatment in male rats. *Bone* 2007;41:639-645.
8. Wechsler H, Nelson TF. Binge drinking and the American college student: what's five drinks? *Psychol Addict Behav* 2001;15:287-291.
9. Callaci JJ, Juknelis D, Patwardhan A, Sartori M, Frost N, Wezeman FH. The effects of binge alcohol exposure on bone resorption and biomechanical and structural properties are offset by concurrent bisphosphonate treatment. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28:182-191.
10. Callaci JJ, Juknelis D, Patwardhan A, Wezeman FH. Binge alcohol treatment increases vertebral bone loss following ovariectomy: compensation by intermittent parathyroid hormone. *Alcohol Clin Exp Res* 2006;30:665-672.
11. Lauing K, Himes R, Rachwalski M, Strotman P, Callaci JJ. Binge alcohol treatment of adolescent rats followed by alcohol abstinence is associated with site-specific differences in bone loss and incomplete recovery of bone mass and strength. *Alcohol* 2008;42:649-656.
12. Macapanpan LC, Weinmann JP. The influence of injury to the periodontal membrane on the spread of gingival inflammation. *J Dent Res* 1954;33:263-272.

- 1 13. Heller IJ, Nanda R. Effect of metabolic alteration of periodontal fibers on
2 orthodontic tooth movement. An experimental study. *Am J Orthod* 1979;75:239-
3 258.
- 4 14. Hamaya M, Mizoguchi I, Sakakura Y, Yajima T, Abiko Y. Cell death of
5 osteocytes occurs in rat alveolar bone during experimental tooth movement. *Calcif*
6 *Tissue Int* 2002;70:117-126.
- 7 15. Dai J, Lin D, Zhang J, Habib P, Smith P, Murtha J et al. Chronic alcohol
8 ingestion induces osteoclastogenesis and bone loss through IL-6 in mice. *J Clin*
9 *Invest* 2000;106:887-895.
- 10 16. Retamoso L, Knop L, Shintcovsk R, Maciel JV, Machado MA, Tanaka O.
11 Influence of anti-inflammatory administration in collagen maturation process during
12 orthodontic tooth movement. *Microsc Res Tech* 2011;74:709-713.
- 13 17. Verna C, Dalstra M, Melsen B. The rate and the type of orthodontic tooth
14 movement is influenced by bone turnover in a rat model. *Eur J Orthod*
15 2000;22:343-352.
- 16 18. Drevensek M, Sprogar S, Boras I, Drevensek G. Effects of endothelin
17 antagonist tezosentan on orthodontic tooth movement in rats. *Am J Orthod*
18 *Dentofacial Orthop* 2006;129:555-558.
- 19 19. Borges LF, Gutierrez PS, Marana HR, Taboga SR. Picrosirius-polarization
20 staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in
21 vesical prolapse lesions. *Micron* 2007;38:580-583.
- 22 20. Marquezan M, Bolognese AM, Araujo MT. Effects of two low-intensity laser
23 therapy protocols on experimental tooth movement. *Photomed Laser Surg*
24 2010;28:757-762.
- 25 21. Braga SM, Taddei SR, Andrade I, Jr., Queiroz-Junior CM, Garlet GP, Repeke
26 CE et al. Effect of diabetes on orthodontic tooth movement in a mouse model. *Eur*
27 *J Oral Sci* 2011;119:7-14.
- 28 22. Tomizuka R, Shimizu Y, Kanetaka H, Suzuki A, Urayama S, Kikuchi M et al.
29 Histological evaluation of the effects of initially light and gradually increasing force
30 on orthodontic tooth movement. *Angle Orthod* 2007;77:410-416.
- 31 23. Miyoshi K, Igarashi K, Saeki S, Shinoda H, Mitani H. Tooth movement and
32 changes in periodontal tissue in response to orthodontic force in rats vary
33 depending on the time of day the force is applied. *Eur J Orthod* 2001;23:329-338.
- 34 24. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical
35 data. *Biometrics* 1977;33:159-174.

- 1 25. Naimi TS, Brewer RD, Mokdad A, Denny C, Serdula MK, Marks JS. Binge
2 drinking among US adults. JAMA 2003;289:70-75.
- 3 26. Windle M. Alcohol use among adolescents and young adults. Alcohol Res
4 Health 2003;27:79-85.
- 5 27. Sampson HW, Gallagher S, Lange J, Chondra W, Hogan HA. Binge drinking
6 and bone metabolism in a young actively growing rat model. Alcohol Clin Exp Res
7 1999;23:1228-1231.
- 8 28. Maran A, Zhang M, Spelsberg TC, Turner RT. The dose-response effects of
9 ethanol on the human fetal osteoblastic cell line. J Bone Miner Res 2001;16:270-
10 276.
- 11 29. Diez A, Puig J, Serrano S, Marinoso ML, Bosch J, Marrugat J et al. Alcohol-
12 induced bone disease in the absence of severe chronic liver damage. J Bone
13 Miner Res 1994;9:825-831.
- 14 30. Johnell O, Nilsson BE, Wiklund PE. Bone morphometry in alcoholics. Clin
15 Orthop Relat Res 1982:253-258.
- 16 31. Cheung RC, Gray C, Boyde A, Jones SJ. Effects of ethanol on bone cells in
17 vitro resulting in increased resorption. Bone 1995;16:143-147.
- 18 32. Crilly RG, Anderson C, Hogan D, Delaquerriere-Richardson L. Bone
19 histomorphometry, bone mass, and related parameters in alcoholic males. Calcif
20 Tissue Int 1988;43:269-276.
- 21 33. Preedy VR, Sherwood RA, Akpoguma CI, Black D. The urinary excretion of the
22 collagen degradation markers pyridinoline and deoxypyridinoline in an
23 experimental rat model of alcoholic bone disease. Alcohol Alcohol 1991;26:191-
24 198.
- 25 34. Eriksen EF, Charles P, Melsen F, Mosekilde L, Risteli L, Risteli J. Serum
26 markers of type I collagen formation and degradation in metabolic bone disease:
27 correlation with bone histomorphometry. J Bone Miner Res 1993;8:127-132.
- 28 35. von Bohl M, Maltha JC, Von Den Hoff JW, Kuijpers-Jagtman AM. Focal
29 hyalinization during experimental tooth movement in beagle dogs. Am J Orthod
30 Dentofacial Orthop 2004;125:615-623.

31

32