

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO ORTODONTIA

DENISE ODETE MANARELLI

AÇÃO DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO SOBRE O LIGAMENTO
PERIODONTAL DURANTE O MOVIMENTO DENTÁRIO INDUZIDO EM RATOS

CURITIBA 2010

DENISE ODETE MANARELLI

AÇÃO DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO SOBRE O LIGAMENTO
PERIODONTAL DURANTE O MOVIMENTO DENTÁRIO INDUZIDO EM RATOS

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

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Souza Camargo

CURITIBA 2010

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Carlos Davi Manarelli e Elizabete Fátima do Prado Manarelli, que em nenhum momento mediram esforços para a realização dos meus sonhos, que me guiaram pelos caminhos corretos, me auxiliaram a fazer as melhores escolhas, ensinaram que a honestidade e a humildade são essenciais à vida, e que jamais devemos desistir de lutar pelo nosso objetivo de vida. A eles devo a pessoa que me tornei, por isso sou uma pessoa extremamente grata e tenho o maior orgulho de chamá-los de pai e mãe.

À meu irmão, Carlos Alexandre Manarelli, que além de irmão, é meu melhor amigo, sempre me acompanhou nos momentos de tristeza e também nos de alegria. Sempre foi para mim um exemplo de pessoa que busca o ideal de vida apesar de todos os obstáculos presentes.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Profa. Dra. Elisa Souza Camargo, que não é apenas uma professora, se tornou amiga ao longo desses dois anos de curso, sempre muito carismática, e positiva. Agradeço por todas as colaborações feitas, pela paciência em corrigir meus erros, confiança em acreditar no meu talento, orientação, apoio nas horas impossíveis, incentivo para continuar seguindo em frente, e acima de tudo pela dedicação dispensada para me ajudar a realizar esse sonho.

À minha grande amiga Jucienne Salgado Ribeiro, que me guiou a entrar no mestrado de Ortodontia, sem seus empurrõezinhos com certeza eu não teria realizado a prova para seleção de alunos do mestrado. Sempre estive e permanece ao meu lado, incentivando, apoiando, dando suporte para realização dessa conquista. Obrigada mais uma vez.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado a oportunidade de realização desse momento, por iluminar meus passos, por me guiar nessa jornada, e sem Ele, nada teria sido possível.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pela formação acadêmica e oportunidade de realização desse curso de mestrado.

Aos meus mestres, professores da Pós-Graduação de Odontologia, Área de Concentração Ortodontia da PUCPR, Dr. Orlando Motohiro Tanaka, Dr. Hiroshi Maruo, Dr. Odilon Guariza Filho, Dra. Elisa Souza Camargo por todo o auxílio, aprendizado, experiência e conhecimento.

À minhas amigas distantes: Debora Vollweiter, Mônica Harumi Takano, Taiana Araújo Fernandes, Naira Araújo Fernandes, Tasla Mescolin, Adriana Vasconcelos, que sempre me apoiaram e entenderam minha ausência nesses dois anos de mestrado.

Ao professor José Vinicius Bolognesi Maciel, que durante o desenvolvimento da pesquisa esteve presente, auxiliando nas decisões importantes, e se dedicou sem esperar nada em troca.

À professora Dra. Aline Cristina Batista Rodrigues Johann, por toda a cooperação e ajuda na descrição dos resultados obtidos no trabalho, cooperação e paciência nos ensinamentos do photoshop, sendo extremamente fundamental para a conclusão desta dissertação.

Ao Biotério da PUCPR, pelo suporte à pesquisa, fornecendo e promovendo a manutenção dos animais utilizados.

Ao técnico do laboratório Misael Gomes Barbosa, por toda a contribuição durante a parte experimental do trabalho, às funcionária do Laboratório de Patologia Experimental Ana Paula Camargo Martins e à professora Dra. Lucia Noronha, pelo auxílio na execução dessa pesquisa.

Às funcionárias do Laboratório de Patologia Experimental Ana Paula Camargo Martins e Marina Luise Viola de Azevedo pela atenção e dedicação às suas atribuições, nos facilitando a jornada.

À banca examinadora do Exame de qualificação de dissertação: Profs. Drs. Odilon Guariza Filho, Luciana Reis de Azevedo Alanis e Orlando Tanaka pelas excelentes sugestões recebidas para esse trabalho.

À banca examinadora da Defesa de dissertação: Profs. Drs. Odilon Guariza Filho, Margareth Maria Gomes de Souza e Orlando Tanaka por terem aceitado o convite e pelo tempo dispensado na avaliação desta pesquisa.

Ao professor Dr. Sérgio Aparecido Ignácio, pela realização e auxílio na interpretação dos resultados estatísticos.

A meus colegas de mestrado Alinne Ulbrich Mores Rymovicz, Ana Leticia Rocha Avila, Cristina Hepp, Dolores Fátima Campos Navarro, Gabriela Pinto Molina da Silva, Ismael Signori, Lilian Mary Karakida, Lourenço Cattani, Maiara Medeiros Ronsani, Maria Cecília Galacini Añez e Thiago Martins Meira, por todo carinho, compreensão e experiências divididas.

Aos alunos de graduação do Curso de Odontologia da PUCPR, que nos aceitaram como auxiliares de ensino, nesse período na ação docente.

Aos nossos pacientes da clínica de Ortodontia, pela credibilidade e confiança em cada atendimento.

Aos funcionários da Clínica de Odontologia da PUCPR, pela amizade, e prontidão.

Ao Professor Dr. Sérgio R Vieira, Coordenador da Pós-Graduação em Odontologia da PUCPR.

A todos que direta ou indiretamente participaram da concretização desse sonho.

LISTA DE ABREVIATURAS

AH – Área Hialina

C – Grupo Controle

CC – Cementoclasto

D – Dentina

E – Grupo Experimental

FB – Fibroblastos

FC – Fibras Colágenas

HC – Hormônio de crescimento

LH – Lacunas de Howship

LP – Ligamento Periodontal

OC – Osteoclastos

OA – Osso alveolar

RS – Reabsorção Solapante

UI – Unidades Internacionais

VS – Vasos Sanguíneos

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Fotomicrografias do Grupo Controle e Experimental, no 3 ^o dia.....	25
FIGURA 2 - Sequência de procedimentos para a instalação do dispositivo ortodôntico.....	56
FIGURA 3 - Fotomicrografias do Grupo Controle, nos 1 ^o , 2 ^o e 3 ^o dias.....	65
FIGURA 4 - Fotomicrografias do Grupo Controle, nos 5 ^o , 7 ^o e 14 ^o dias.....	66
FIGURA 5 - Fotomicrografias do Grupo Experimental, nos 1 ^o , 2 ^o e 3 ^o dias.....	67
FIGURA 6 - Fotomicrografias do Grupo Experimental, nos 5 ^o , 7 ^o e 14 ^o dias.....	68
FIGURA 7 - Fotomicrografias do Grupo Saizen.....	69

SUMÁRIO

1- ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	02
PAGÍNA TÍTULO.....	03
RESUMO.....	04
INTRODUÇÃO.....	05
MATERIAL E MÉTODOS.....	07
RESULTADOS.....	10
DISCUSSÃO.....	13
CONCLUSÃO.....	17
REFERÊNCIAS.....	18
TABELAS.....	23
FIGURAS.....	25
2- ARTIGO EM INGLÊS.....	26
TITLE PAGE.....	27
ABSTRACT.....	28
INTRODUCTION.....	29
METHOD.....	31
RESULTS.....	34
DISCUSSION.....	36
CONCLUSION.....	40
REFERENCES.....	41
TABLES.....	46
FIGURES.....	48
3- ANEXOS.....	49
ANEXO 1- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	50
ANEXO 2- MATERIAL E MÉTODO.....	51
ANEXO 3 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
ANEXO 4- ILUSTRAÇÕES.....	65
ANEXO 5- NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERÍODICO <i>JOURNAL</i> <i>OF THE AMERICAN DENTAL ASSOCIATION</i>	70

1- ARTIGO EM PORTUGUÊS

PÁGINA TÍTULO

AÇÃO DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO SOBRE O LIGAMENTO PERIODONTAL DURANTE O MOVIMENTO DENTÁRIO INDUZIDO EM RATOS

DENISE ODETE MANARELLI

Cirurgiã-dentista PUCPR

Mestranda em Odontologia - Ortodontia PUCPR

Rua: Ariranha, 339 vila A, 85861-140 – Foz do Iguaçu-PR

E-mail : manarelli.denise@gmail.com

Corresponding Author:

ELISA SOUZA CAMARGO

Doutora em Odontologia - Ortodontia – FO-UFRJ

Professora Adjunta da Graduação e Pós-Graduação em Odontologia – PUCPR

Rua: Fernando Simas, 327 – 80430-190 – Curitiba-PR

Telefone/Fax: 55 41 3323 5835

E-mail: elisa.camargo@pucpr.br

RESUMO

Existem evidências da interferência do hormônio de crescimento (HC) na regulação do metabolismo ósseo. Os autores investigaram o efeito do uso crônico do HC sobre o ligamento periodontal durante movimento dentário induzido com força de alta magnitude em ratos.

Métodos- Grupos: controle (30 ratos, movimento dentário – 100cN) e experimental (30 ratos, movimento dentário – 100cN e administração de HC), nos períodos de observação de 1, 2, 3, 5, 7 e 14 dias e Saizen (05 ratos, somente HC). A amostra foi processada e realizou-se avaliação histológica qualitativa e quantitativa, com microscopia de luz.

Resultados- O teste de comparações múltiplas de Games-Howell para variâncias heterogêneas verificou que o grupo experimental apresentou maior quantidade de osteoclastos e de vasos sangüíneos no 3º dia.

Conclusões- O uso crônico do HC antecipou e intensificou a reabsorção óssea durante movimento dentário induzido com força de alta magnitude, em ratos.

Palavras chave: Hormônio de crescimento; movimento dentário; ligamento periodontal.

INTRODUÇÃO

A movimentação ortodôntica é um processo biológico múltiplo, caracterizado por reações sequenciais em resposta às forças biomecânicas que induzem alterações no ligamento periodontal. As modificações teciduais induzidas estão relacionadas à remodelação por ativação da reabsorção óssea alveolar no lado de compressão e consequente aposição óssea no lado de tensão (Macapanpan e Weinmann, 1954; Heller e Nanda, 1979; Hamaya, et al., 2002; Shirazi, et al., 2002).

Pesquisas tem sido realizadas no sentido de verificar a possível interferência de fatores sistêmicos e fármacos utilizados por pacientes em tratamento ortodôntico, no metabolismo ósseo, no mecanismo inflamatório ou em ambos (Gameiro et al, 2008).

Além disso, este hormônio é responsável pelo crescimento longitudinal do osso durante a infância e adolescência por meio de outra função sobre os condrócitos das epífises (Russel e Spencer, 1985). Há também evidências que indicam importante função do HC na manutenção da massa óssea em adultos (Brixen et al., 1990; Rudman, et al., 1990; O'Halloran, et al., 1993).

O HC sintético é indicado em múltiplas doenças e situações não patológicas. Algumas indicações foram aprovadas por órgãos reguladores, como para baixa estatura em crianças, deficiência de HC, insuficiência renal crônica, síndrome de Turner, síndrome de Pradder-Willi, adultos com deficiência ou insuficiência de HC devido a lesões hipofisárias, perda de massa muscular por

debilidade associada a AIDS e doença pulmonar obstrutiva crônica (Pape et al., 1991; Carrol et al., 1998; Simpson et al., 2002).

Este hormônio vem sendo também utilizado por alguns atletas de forma ilícita e sem supervisão médica, para desacelerar o processo de envelhecimento e aumentar o desempenho atlético (Ehrnbom e Rósen, 2008). Rudman et al., 1990 relatam o uso do HC para reverter algumas mudanças relacionadas com o envelhecimento que estão associadas com redução deste hormônio nos níveis sanguíneos, e sua administração pode ocasionar aumento da densidade do colágeno da pele e/ou aumento da massa corpórea magra, massa muscular e massa óssea.

A Somatropina ou HC, é um polipeptídeo constituído por 191 aminoácidos, secretado pela hipófise. Este hormônio e seu mediador, *insulin-like growth factor-I* (IGF-I), apresentam função primordial na regulação do metabolismo ósseo e no crescimento ósseo pós-natal. O HC tende a diminuir o catabolismo protéico mobilizando gordura como fonte energética mais eficiente e aumenta o número de células em vez do tamanho das mesmas (Swolin-Eide, et al., 1998).

O HC é um dos mais importantes reguladores da remodelação e crescimento ósseo (Tresguerres et al, 2005); supõe-se que este hormônio pode agir diretamente nos osteoclastos maduros e seus precursores ou indiretamente sobre células não osteoclásticas, a exemplo, os osteoblastos (Russel e Spencer, 1985). Estas células são as principais responsáveis pela remodelação do osso alveolar decorrente da aplicação de uma força ortodôntica, portanto, a presença

do HC associada à biomecânica ortodôntica poderia influenciar a remodelação óssea subsequente.

Desta forma, o uso deste hormônio como suplemento por indivíduos em tratamento ortodôntico poderia alterar as respostas biológicas decorrentes do movimento dentário induzido. A literatura é escassa de pesquisas que tenham verificado esta interação; desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar histologicamente a ação do uso crônico do HC sobre o ligamento periodontal durante movimento dentário induzido com força de alta magnitude, em ratos *Wistar*.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado com parecer nº 545 pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da PUCPR.

Amostra

Foram utilizados 65 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com 9 semanas de vida, pesando aproximadamente 300 a 350g, fornecidos e mantidos pelo Biotério da PUCPR. Os animais foram acondicionados em gaiolas metálicas, com temperatura entre 19°C e 22°C e fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro para evitar alterações no ciclo metabólico. Foram fornecidos água e ração triturada *ad libitum*.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos:

Grupo Controle (C) - 30 animais mortos após 1, 2, 3, 5, 7 e 14 dias de movimento dentário induzido (100cN). Cada um destes dias de observação continha 5 animais.

Grupo Experimental (E) - 30 animais mortos após 1, 2, 3, 5, 7 e 14 dias de movimento dentário induzido (100cN), sob ação de SAIZEN® 1,33 mg (4UI) - 0,035mg/kg/dia, administrado 30 dias antes da aplicação da força até o dia da morte. Cada um destes dias de observação continha 5 animais.

Grupo SAIZEN (SA) - 5 animais mortos após 30 dias sob administração de SAIZEN® 1,33 mg (4UI) - 0,035mg/kg/dia, para caracterizar o ligamento periodontal do rato apenas com o hormônio de crescimento sem aplicação de força ortodôntica.

Experimento (Figura 2, página 56)

O hormônio de crescimento sintético selecionado foi o SAIZEN® 1,33 mg (4UI) - Serono Prods. Farms. Ltda. – Somatropina (r-hGH) - (Lote Y06A1957, Fabricação: 02/09, Validade: 02/10, Registro 1.1124.0184, Laboratoires Serono, Aubonne, Suisse). A dosagem utilizada foi 0,035mg/kg/dia (Allen *et al.*, 1998), e a administração sempre realizada no período da manhã, via subcutânea, na região abdominal alternando entre o lado direito e o esquerdo.

Para avaliar a evolução das reações teciduais ao movimento dentário induzido ao longo do tempo, foi aplicada força por meio de um aparelho ortodôntico construído a partir do modelo proposto por Heller e Nanda (1979), que consistiu em uma mola de *nickel titanium* fechada (G&H Wire®) e fio de amarrilho de aço inox com 0,0020 polegada, para fixação da mola no primeiro molar superior direito e nos incisivos superiores. A força de 100 cN produzida pela mola

foi padronizada com um dispositivo previamente calibrado. Após a ativação inicial, o aparelho não foi reativado durante o período experimental, no entanto seu posicionamento foi conferido diariamente.

Para instalação do aparelho ortodôntico, os animais foram sedados com solução anestésica Tiletamina/Zolazepam (Zoletil 50® do Brasil Indústria e Comércio Ltda, São Paulo- SP, Virbac), na dosagem de 50mg/kg de peso corporal e média de volume de 0,25ml/animal. Esta substância foi injetada no músculo quadríceps do membro inferior esquerdo.

Os animais foram mortos por dose excessiva de solução anestésica Tiletamina/Zolazepam (Zoletil 50® do Brasil Indústria e Comércio Ltda, São Paulo- SP, Virbac), via intraperitoneal. Após a dissecação e corte da região do primeiro molar superior direito, as peças foram fixadas em formalina 10% tamponado por 72 horas e desmineralizados em solução de EDTA 4,13% por aproximadamente 12 semanas. Obtida a desmineralização, foram realizados cortes transversais na região cervical do referido dente. Os cortes foram corados por hematoxilina-eosina de Harris e Lison (HE).

Análise Microscópica e Morfometria

Na análise qualitativa observou-se a disposição das fibras colágenas (FC), a morfologia dos fibroblastos (FB) e a presença de reabsorção solapante (RS) no ligamento periodontal (LP) da raiz intermediária vestibular e verificou-se a presença de áreas hialinas (AH) em todas as raízes do 1^o molar superior direito.

A análise quantitativa foi realizada para reconhecer e quantificar os osteoclastos (OC), lacunas de *Howship* (LH) e vasos sanguíneos (VS) presentes

nas áreas de tração e de compressão do LP da raiz intermediária vestibular do primeiro molar superior direito, os quais foram contados manualmente.

O critério histológico utilizado para identificar osteoclastos foi a presença de células eosinofílicas e multinucleadas adjacentes à superfície do osso alveolar (Arias e Márquez-Orosco, 2006). As lâminas foram analisadas sob microscopia de Luz, com aumento original de 400X. Essa análise foi realizada por um único observador devidamente calibrado que desconhecia o grupo a que cada lâmina pertencia.

Análise Estatística

Na análise estatística visando comparar os grupos entre si, foi aplicado o teste ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Games-Howell para variâncias heterogêneas, e para verificar se havia correlação entre as variáveis OC e LH utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson.

RESULTADO

ANÁLISE QUALITATIVA

Grupo Controle (C), somente com movimentação ortodôntica:

No 1º dia, em toda a extensão do LP, observou-se feixes de FC desorganizadas no lado de compressão com predomínio de FB arredondados, enquanto no lado de tração, observou-se disposição das fibras mais organizadas estando elas estiradas e paralelas entre si com predomínio de FB fusiformes. Observou-se pouca quantidade de VS estando eles comprimidos no lado de

compressão e dilatados na área tracionada. Verificou-se também, a presença de RS (Figura 3 A e B, página 65).

No 2º dia, nenhuma mudança foi observada, mantendo-se os mesmos resultados (Figura 3 C e D, página 65). A partir do 3º dia, as FC tornaram-se mais desorganizadas no lado de compressão, o número de OC e VS alcançaram o maior número (Figura 3 E e F, página 65). Notou-se também, presença de RS. À medida que os OC aumentaram, as LH aumentaram concomitantemente.

A partir do 5º dia houve um decréscimo no número de OC e VS, porém, ainda havia a presença de RS. Ambas as variáveis diminuíram progressivamente até o 14º dia. As disposições das FC mantiveram-se iguais, diminuindo levemente na intensidade de desorganização (Figura 4 G a L, página 66).

Grupo Experimental (E), administração de HC e movimentação ortodôntica:

Nos 1º e 2º dias as disposições das FC no lado de compressão apresentavam-se desorganizadas com predomínio de FB arredondados enquanto no lado tracionado encontravam-se estiradas com FB fusiformes. A mesma disposição se manteve ao longo de todos os dias do grupo experimental, variando somente na intensidade. Observou-se pouca quantidade de VS estando eles comprimidos no lado de compressão e dilatados na área tracionada e pode-se observar presença de RS (Figura 5 A a D, página 67).

Os eventos acima descritos foram se intensificando, atingindo o maior número de OC no 3º dia (E3). À medida que os OC aumentaram as LH aumentaram concomitantemente (Figura 1 C e D, página 25).

A partir do 5º ao 14º dia o número de OC diminuiu consideravelmente, assim como o de VS. Observou-se também, melhor organização das FC no lado de compressão quando se comparou ao grupo C, verificou-se também presença de RS, porém com menos frequência do 7º ao 14º dia (Figura 6 G a L, página 68).

Grupo SAIZEN (SA), somente administração de HC:

No grupo SA, observou-se nas faces mesial e distal, FC organizadas, dispostas no ligamento periodontal LP, com predomínio de FB fusiformes. Verificou-se grande número de VS, poucos OC, ausência de AH, RS e cementoclastos (CC) (Figura 7 A e B, página 69).

ANÁLISE QUANTITATIVA

Ao analisar os valores médios das variáveis OC, LH e VS segundo grupo, independente de tempo, o teste ANOVA indicou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos valores médios de OC e VS, não ocorrendo diferença estatisticamente significativa entre LH (Tabela 1, página 23).

Nos 1º, 2º, 5º, 7º e 14º dias após a indução do movimento dentário, o teste de Games-Howell de comparações múltiplas não identificou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os grupos C x E em relação aos OC, LH e VS (Tabela 3, página 64).

Ao se comparar os grupos, C x E no 3º dia, o E apresentou maior número de OC e de VS quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$) (Tabela 1, página 23, Gráfico 1, página 60, e Gráfico 3, página 62).

O teste de correlação de Pearson verificou correlação positiva e forte entre OC e LH (0,68772), ou seja, observou-se que à medida que aumentou o número de OC houve também aumento no número de LH (Tabela 2, página 24 e gráfico 4, página 63).

DISCUSSÃO

A aplicação de força em um dente produz reações teciduais que estão associadas a fatores locais relacionados aos dentes e à oclusão, e também a fatores sistêmicos relacionados ao metabolismo ósseo (Verna e Melsen, 2003). Estudos mostram que alguns hormônios podem afetar este metabolismo. Os hormônios estrógenos parecem diminuir a reabsorção óssea (Tyrovola e Spyropoulos, 2001) e a administração do paratormônio por infusão contínua acelera o movimento dentário em ratos (Soma et al., 1999 e Soma et al., 2000).

Alguns autores demonstraram que o HC participa da remodelação óssea ao estimular os osteoblastos (Tanaka e Seino, 1996) e os osteoclastos (Nishiyama et al., 1996) durante a aposição e a reabsorção óssea, respectivamente. No ligamento periodontal de ratos, o HC por si só não parece ser capaz de gerar alterações celulares, uma vez que na presente pesquisa, nos cortes histológicos do grupo SA foram observadas características semelhantes às

de um LP normal. Sugere-se, portanto, que as alterações observadas no LP do grupo E no presente estudo, foram devidas à combinação das variáveis força e HC.

Nos períodos iniciais do movimento dentário, nos grupos C e E foram observados nos lados de tração e de compressão do LP, fenômenos inflamatórios decorrentes de forças biomecânicas de alta magnitude, como a utilizada nesta pesquisa. De acordo com Macapanpan e Weinmann, 1954; Kuftinec, 1968; Heller e Nanda, 1979; Hamaya et al., 2002; Mabuchi et al., 2002 e Talic et al., 2003, quando aplica-se força excessiva no LP, ocorrem distúrbios no fluxo sanguíneo, necrose, morte celular, fagocitose dos restos celulares, hialinização tecidual, estreitamento da largura do LP e reabsorção óssea nas proximidades das áreas hialinizadas por OC multinucleados associados a LH.

Áreas de hialinização foram observadas em todos os períodos analisados em ambos os grupos com movimento dentário (C e E), principalmente no lado de compressão. Estas áreas caracterizam-se pela ausência de células, as quais se tornaram inviáveis e necrosaram (Kvam, 1972). Em maior grau no 3º dia, segmentos inteiros de tecido sem células e sem vasos funcionantes foram verificados, os quais deveriam estar presentes, para que propiciassem a reabsorção da superfície periodontal da cortical óssea alveolar (frontal); sem essa condição, todos os eventos de estresse celular e inflamação acontecem à distância do local desejado (Consolaro, 2002).

Da mesma forma, os experimentos com indução de movimentação dentária de Reitan et al., 1971, evidenciaram AH e lacunas de reabsorção contendo OC nas superfícies alveolares contíguas às áreas hialinas do lado de compressão do

ligamento periodontal. Ainda, de acordo com Ren et al., 2002, as AH observadas em tempos variados de movimentação dentária são compatíveis com forças de grande magnitude, semelhantes às utilizadas neste experimento.

No lado de tração dos grupos C e E também foram observadas AH, porém em menor extensão. Segundo Buckley, 1990, se as forças forem de alta magnitude, podem ser visualizadas áreas de reabsorção óssea, mesmo sendo o lado de tração, pois há o aumento excessivo do nível local dos mediadores químicos e os fenômenos comuns às áreas de compressão se estabelecem nestas condições.

A compressão excessiva no LP causa, ainda, RS, na qual todos os eventos de estresse celular e inflamação acontecem à distância (Reitan, 1959), conforme visto neste trabalho. Este tipo de reabsorção é indesejável, pois à medida que acontece, aproximando-se da cortical, grande destruição óssea se estabelece, muitas vezes, deixando sequelas, como o rebaixamento da crista óssea alveolar. Além disso, causa dor e desconforto, porque o movimento não ocorre de maneira controlada, mas sim abrupta e intensamente (Consolaro, 2002). As AH e RS foram observadas nos grupos C e E de maneira semelhante, portanto não se pode afirmar que o HC foi responsável por esse evento, mas sim a força excessiva que foi utilizada.

Por outro lado, o maior número de osteoclastos no 3º dia no grupo E em relação ao grupo C, provavelmente ocorreu pela influência do HC. Este hormônio atua diretamente na proliferação e diferenciação dos osteoblastos (Tresguerres, et al., 2005), assim como estimula o *turnover* ósseo, ocasionando o aumento da síntese protéica e mineralização (Marcus, 1997) e, mais especificamente, nas

proteínas da matriz óssea (Tresguerres et al., 2005). Nossos resultados concordam com os de Tresguerres et al., 2005, que verificaram aumento da reabsorção óssea após uma semana de aplicação local de 1,2 mg de HC no tecido peri-implantar em coelhos. Ribeiro, 2008, realizou movimento dentário em ratos nos quais este hormônio estava sendo administrado e também observou que o HC acelerou e intensificou a reabsorção óssea e ocasionou um retardo da formação de colágeno imaturo, embora este estudo não tenha avaliado o efeito do uso crônico do HC, mas sim a administração apenas durante a realização do movimento ortodôntico.

Observou-se aumento no número de VS nos grupos C e E no período inicial do movimento dentário induzido. Segundo Toms et al (2000) proliferação vascular é observada no LP de dentes movimentados ortodonticamente, favorecendo os processos regenerativos característicos desta região, sendo um importante mediador para o processo de remodelação óssea. Entretanto, houve maior aumento no número de VS no grupo E quando comparado ao C, o que provavelmente se deve à presença do HC nos animais deste grupo. A literatura é escassa de pesquisas que esclareçam se o HC modula a angiogênese, porém há evidência de que quando há deficiência ou excesso deste hormônio, a função vascular pode ser modificada (Silha et al., 2005).

Talvez com a angiogênese aumentada, como observada em nossos resultados, o HC possa ocasionar um efeito bifásico no osso atuando concomitantemente com a ativação da reabsorção óssea e posteriormente a neoformação (Danahue e Rosen, 1999, Ackert-Bicknell et al., 2002). A avaliação da formação óssea, contudo, não foi objetivo da presente pesquisa.

Os resultados desta pesquisa sugerem que o HC quando associado ao movimento dentário induzido com força de alta magnitude possui competência para estimular a reabsorção óssea. Portanto, indivíduos em tratamento ortodôntico e que utilizam o HC necessitam de intervalos maiores entre as aplicações das forças ortodônticas e aplicação de forças de menor magnitude, uma vez que o processo de reabsorção óssea é mais intenso. Controle radiográfico deve ser feito frequentemente para avaliar o padrão de reabsorção óssea.

CONCLUSÃO

O uso crônico do hormônio de crescimento associado a uma força de alta magnitude, antecipou e intensificou a reabsorção óssea durante o movimento dentário induzido em ratos *Wistar*.

- 1- Ackert-Bicknell C, Rubin J, Zhu L, et al. IGF-I Acts as a coupling factor for bone remodeling by regulating osteoprotegerin and RANK ligand in vitro and osteoprotegerin in vivo. 84th annual meeting of the endocrine society. San Francisco, CA; 2002:3-366.
- 2- Allen DB. Growth Hormone Therapy For Short Stature: Is The Benefit Worth The Burden? Pediatrics 2006;118:343-348.
- 3- Arias OR, Marquez-Orosco MC. Aspirin, acetaminophen, and ibuprofen: their effects on orthodontic tooth movement. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2006; 130 (3):364-370.
- 4- Buckley MJ, Banes AJ, Jordan RD. The effects of mechanical strain on osteoblasts in vitro. J Oral Maxillofac Surg 1972;5(3):507-516.
- 5- Brixen K, Nielsen HK, Mosekilde L, et al. A short course of recombinant human growth hormone treatment stimulates osteoblasts and activates bone remodeling in normal human volunteers. J Bone Miner Res 1990; 5(6): 609-18.
- 6- Carrol PV, Christ ER, Bengtsson BA, et al. Growth hormone deficiency in adulthood and the effects of growth hormone replacement: a review. J Clinical Endocrinol Metab 1998; 83(2): 382-395.
- 7- Consolaro A. Movimentação dentária induzida: biologia aplicada à prática clínica. In: Consolaro A. Reabsorções Dentárias nas Especialidades Clínicas. Maringá: Dental Press 2002:221-57.

- 8- Danahue LR, Rosen CJ. Growth Hormone and Insulin-like growth factor I as therapeutic modalities for age related osteoporosis. In: Rosen CJ, Glowacki J, Bilezikian JP. The aging skeleton. San Diego: Academic Press, 1999. P. 579-84.
- 9- Dudic A, Kiliaridis S, Mombelli A, et al. Composition changes in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: comparisons between tension and compression sides. Eur J Oral Sci 2006; 114(5): 416-22.
- 10-Ehrnbor C, Rósen T. Physiological and pharmacological basis for the ergogenic effects of growth hormone in elite sports. Asian J Androl 2008; 10(3): 373-383.
- 11-Fontes EM. Métodos de eutanásia. Rev Port Cien Vet 1955; 40:104-9.
- 12-Gameiro H, Nouer DF, Magnani MBBA, et al. Evaluation of root resorption associated with orthodontic movement in stressed rats. Minerva Stomatol 2008, 57:569-575.
- 13-Hamaya M, Mizoguchi I, Sakakura Y, et al. Cell death of osteocytes occurs in rat alveolar bone during experimental tooth movement. Calcif Tissue Int 2002; 70(2):117-26.
- 14-Heller IJ, Nanda R. Effect of metabolic alteration of periodontal fibers on orthodontic tooth movement. An experimental study. Am J Orthod 1979; 75(3): 239-58.
- 15-Kuftinec MM. Vascular changes due to the application of force to the molar teeth in hamsters. J Dent Res 1968; 47(6): 916-8.

- 16-Kvam, E. Cellular dynamics on the pressure side of the rat periodontium following experimental tooth movement. *Scand. J. Dent. Res.*, 1972; 80(5):369-383.
- 17-Mabuchi R, Matsuzaka K, Shimono M, et al. Cell proliferation and cell death in periodontal ligaments during orthodontic tooth movement. *J Periodontal Res* 2002; 37(2): 118-24.
- 18-Macapanpan LC, Weinmann JP. The influence of injury to the periodontal membrane on the spread of gingival inflammation. *J Dent Res* 1954; 33(2): 263-72.
- 19-Marcus R. Skeletal effects of growth hormone and IGF-I in adults. *Horm Res* 1997; 48(suppl 5): 60-64.
- 20-Nishiyama K, Sugimoto T, Kaji H, et al. Stimulatory effect of growth hormone on bone resorption and osteoclast differentiation 1996; 137(1):35-41.
- 21-O'Halloran DJ, Tsatsoulis A, Whitehouse RW, et al. Increased bone density after recombinant human growth hormone (GH) therapy in adults with isolated GH deficiency. *J Clin Endocrin Metab* 1993; 76(5): 1344-8.
- 22-Pape GS, Friedman M, Underwood LE, et al. The effect of growth hormone on weight gain and disease pulmonary function in patients with chronic obstructive lung disease 1991; 99(6):1495-1500.
- 23-Reitan RM. The comparative effects of brain damage on the Halstead impairment index and the Wechsler-Bellevue scale. *J Clin Psychol* 1959; 15(3):281-5.

- 24-Reitan K, Kvam E. Comparative behavior of human and animal tissue during experimental tooth movement. *Angle Orthod* 1971;41(1):1-14.
- 25-Ren Y, Maltha JC, Van't Hof MA, et al. Cytokine levels in crevicular fluid are less responsive to orthodontic force in adults than in juveniles. *J Clin Periodontol* 2002; 29(8):757-62.
- 26-Ribeiro JS. Efeito do hormônio de crescimento no movimento dentário induzido. Dissertação de mestrado em Ortodontia. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. 2008:50.
- 27-Rudman D, Feller AG, Nagraj HS, et al. Effects of human growth hormone in men over 60 years old. *N Engl J Med* 1990; 323(1):1-6.
- 28-Russell SM, Spencer EM. Local injections of human or rat growth hormone or of purified human somatomedin-C stimulate unilateral tibial epiphyseal growth in hypophysectomized rats. *Endocrin* 1985; 116(6): 2563-7.
- 29-Silha JV, Krsek M, Hana V, et al. The effects of growth hormone status on circulating levels of vascular growth factors. *Clin Endocrin* 2005;63:79-86.
- 30-Simpson H, Savine R, Sonksen P, et al. Growth hormone replacement therapy for adults: Into de new millennium. *Growth Horm & IGF Res* 2002; 12(1): 1-33.
- 31-Soma S, Iwamoto M, Higuchi Y, et al. Effects of continuous infusion of PTH on experimental tooth movement in rats. *J Bone Miner Res* 1999; 14(4): 547-554.
- 32-Soma S, Matsumoto S, Higuchi Y, et al. Local and chronic application of PTH accelerates tooth movement in rats. *J Dent Res* 2000; 79(9): 1717-1724.

- 33-Shirazi M, Nilforoushan D, Alghasi H, et al. The role of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. *Angle Orthod*. 2002; 72(3):211-5.
- 34-Swolin-Eide D, Nilsson A, Ohlsson C, et al. Cortisol increases growth hormone-receptor expression in human osteoblast-like cells. *J Endocrinol* 1998; 156(1) p.99-105.
- 35-Talic NF, Evans CA, Daniel JC, et al. Proliferation of epithelial rests of Malassez during experimental tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2003; 123(5): 527-33.
- 36-Tanaka H, Seino Y. Does growth hormone treatment prevent corticosteroid-induced osteoporosis? *Bone* 1996; 18(6): 493-4.
- 37-Toms A, Gannon B, Carati C. The immunohistochemical response of the rat periodontal ligament endothelium to an inflammatory stimulus. *Austr Orthod J* 2000; 16(2): 61-68.
- 38-Tresguerres IF, Alobera MA, Baca R, et al. Histologic, morphometric, and densitometric study of peri-implant bone in rabbits with local administration of growth hormone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005; 20(2): 193-202.
- 39-Tyrovola JB, Spyropoulos MN. Effects of drugs and systemic factors on orthodontic treatment. *Quintessence Int* 2001; 28(5): 365-371.
- 40-Verna C, Melsen B. Tissue reaction to orthodontic tooth movement in different bone turnover conditions. *Orthod Craniofac Res* 2003; 6(3): 155-63.

TABELAS

TABELA 1- ESTATÍSTICA DESCRITIVA DE TODAS AS VARIÁVEIS DE ACORDO COM O TEMPO E TESTE DE GAMES-HOWELL DE COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS INTERGRUPOS E NO MESMO PERÍODO DE OBSERVAÇÃO.

Variável	Dia	Grupo Controle (n=5)			Grupo Experimental (n=5)			Valor p
		Média	Mediana	D.P.	Média	Mediana	D.P.	
Osteoclasto	1	4	4	0,71	5,6	5	2,19	0,87193
	2	9,2	9	6,38	12,6	12	2,07	0,97466
	3	9,8	9	2,59	21	21	1,22	*0,00303
	5	5	4	2,35	7,6	6	3,58	0,94051
	7	4,2	4	0,84	5,4	5	2,7	0,99194
	14	2,4	2	0,55	3,8	4	0,84	0,23785
Lacunas de								
Howship	1	4,8	5	0,45	4,2	4	1,3	0,99069
	2	6,6	4	4,62	6,8	5	4,49	1
	3	9,6	9	0,89	8,8	8	1,92	0,99718
	5	5	5	0,71	5,4	5	1,14	0,99968
	7	4,6	5	1,14	4	3	1,41	0,99933
	14	3,2	3	0,45	3	3	0	0,9865
Vasos								
Sanguíneos	1	5,8	6	0,45	8	7	2	0,52446
	2	3,4	4	1,95	5	5	1,87	0,95171
	3	4,8	5	1,64	9,4	9	0,55	*0,03024
	5	4,2	4	1,3	5,2	5	0,45	0,84796
	7	4,6	5	1,67	5	5	0,71	0,99997
	14	3,2	2	1,79	4,2	4	1,3	0,99138

Fonte: PUCPR

Legenda: D.P. – Desvio Padrão

Nota: * Valores estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

TABELA 2- TESTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON
SEGUNDO VARIÁVEIS ANALISADAS.

Variável	Osteoclastos n=60	Lacunas de Howship n=60	Vasos sanguíneos n=60
Osteoclastos	1	0,68772 0,00000*	0,47648 0,00012*
Lacunas de Howship	0,68772 0,00000*	1	0,27740039 0,031885645
Vasos sanguíneos	0,47648 0,00012*	0,27740 0,03189 *	1

Fonte: PUCPR

Nota: * Valores estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

FIGURAS

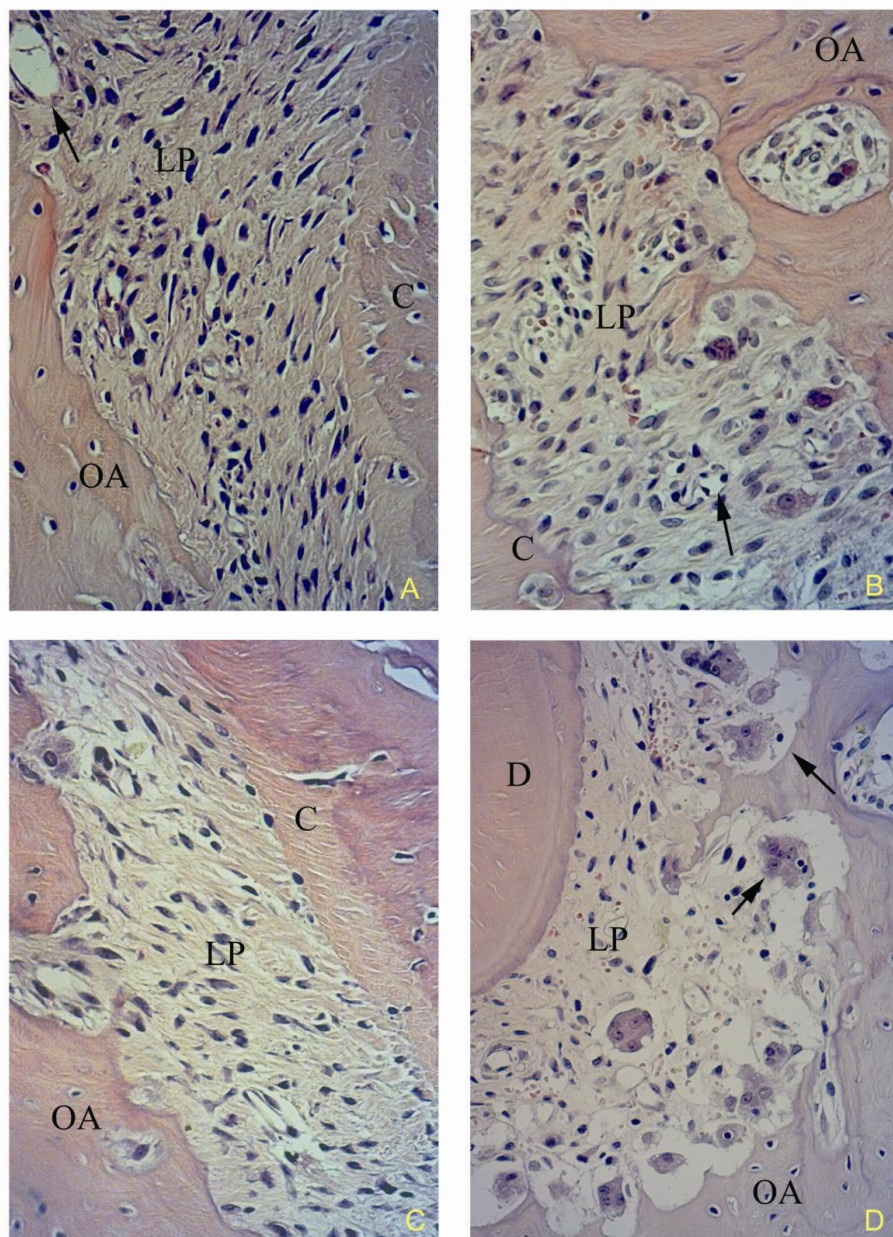


Figura 1 - Fotomicrografias (H.E. - 200x) do Grupo controle, 3^o dia, lado de tração (A) e compressão (B); Grupo Experimental, 3^o dia, lado de tração (C) e compressão (D). Cimento (C), Dentina (D), Osso Alveolar (OA), Ligamento Periodontal (LP), Vaso Sanguíneo (VS), Osteoclasto (OC). Setas em A e B indicam vasos sanguíneos, em D indicam osteoclastos no interior das lacunas de Howship.

2- ARTIGO EM INGLÊS

TITLE PAGE

GROWTH HORMONE ACTION ON THE PERIODONTAL LIGAMENT DURING INDUCED TOOTH MOVEMENT IN RATS

DENISE ODETE MANARELLI

Doctor of Dental Surgery PUCPR

Masters in Dentistry - Orthodontics PUCPR

Street: Ariranha, 339 The Village, 85861-140 - Foz do Iguaçu - PR

E-mail: [manarelli.denise @ gmail.com](mailto:manarelli.denise@gmail.com)

Corresponding Author:

ELISA CAMARGO SOUZA

Doctor of Dental Medicine- Orthodontics - FO-UFRJ

Adjunct Professor of Graduate and Postgraduate Dentistry - PUCPR

Street: Fernando Simas, 327 - 80430-190 – Curitiba - PR

Telephone/Fax: 55 41 3323 5835

E-mail: [elisa.camargo @ pucpr.br](mailto:elisa.camargo@pucpr.br)

ABSTRACT

Evidence exists that growth hormone (GH) interferes with the regulation of bone metabolism. The authors investigated the effect of chronic GH use on the periodontal ligament during tooth movement induced by high-magnitude force in rats.

Methods: the groups were control rats (30 rats, induced tooth movement of 100 cN) and experimental rats (30 rats, induced tooth movement of 100 cN and administration of GH with observation periods of 1, 2, 3, 5, 7 and 14 days) and Saizen® (5 rats, only GH). Samples were evaluated using qualitative and quantitative histology with light microscopy.

Results: the Games-Howell multiple comparison test for heterogeneous variances showed that the experimental group had a higher number of osteoclasts and blood vessels on the third day compared to the control group.

Conclusions: chronic GH use accelerated and intensified bone resorption during tooth movement induced by high-magnitude force in rats.

Clinical implications: orthodontic patients taking GH chronically as a supplement should receive low-magnitude forces over longer intervals prior to new force applications.

Keywords: growth hormone; tooth movement; periodontal ligament.

INTRODUCTION

Orthodontic movement is a multi-faceted biological process that is characterized by sequential reactions in response to biomechanical forces that induce changes in the periodontal ligament. The induced changes in the tissue are related to remodeling for the activation of alveolar bone resorption on the compression side and subsequent bone apposition on the tension side (Macapanpan and Weinmann, 1954; Heller and Nanda, 1979; Hamaya, et al. 2002; Shirazi et al., 2002).

Studies have been conducted to verify the possible interference of systemic factors and drugs used by patients undergoing orthodontic treatment on bone metabolism and/or inflammatory mechanisms (Gameiro et al., 2008).

Moreover, GH is responsible for longitudinal bone growth during childhood and adolescence through its effects on epiphyseal chondrocytes (Russell and Spencer, 1985). There is also evidence suggesting an important function of GH in maintaining bone mass in adults (Brixen et al., 1990; Rudman et al., 1990; O'Halloran et al., 1993).

Synthetic GH is indicated for a number of illnesses and non-pathological situations. Some indications have been approved by regulatory agencies, including short stature in children, GH deficiency, chronic renal insufficiency, Turner syndrome, Pradder-Willi syndrome, adults with disabilities or lack of GH due to pituitary damage, debilitating loss of muscle mass associated with AIDS and chronic obstructive pulmonary disease (Pape et al., 1991; Carroll et al., 1998; Simpson et al., 2002).

This hormone has also been used illegally by some athletes and without medical supervision to slow the aging process and enhance athletic performance (Ehrnbor and Rosen, 2008). Rudman et al. (1990) have reported the use of GH to reverse certain changes associated with aging, ultimately resulting in reduced levels of the hormone. GH administration may lead to increased collagen density in the skin and/or an increase in lean body mass, muscle mass and bone mass.

Somatropin, or GH, is a polypeptide consisting of 191 amino acids that is secreted by the pituitary gland. This hormone and its mediator, *insulin-like growth factor-I* (IGF-I), play an essential role in regulating bone metabolism and in post-natal bone growth. GH tends to decrease protein catabolism by mobilizing fat as the more efficient source of energy and increases the number rather than the size of cells (Swolin-Eide et al., 1998).

GH is one of the most important regulators of bone growth and remodeling (Tresguerres et al., 2005). It is assumed that this hormone can act directly on mature osteoclasts and their precursors or indirectly on non-osteoclastic cells such as osteoblasts (Russel and Spencer, 1985). These are the main cells responsible for remodeling alveolar bone following the application of an orthodontic force. Furthermore, the presence of GH associated with orthodontic biomechanics could influence subsequent bone remodeling.

Therefore, the use of this hormone as a supplement by people undergoing orthodontic treatment could alter the biological responses resulting from induced tooth movement. There have been few studies verifying this interaction, so the purpose of this study was to histologically evaluate the action of chronic GH use

on the periodontal ligament during tooth movement induced by high-magnitude force in Wistar rats.

MATERIALS AND METHODS

This study was approved by PUCPR's Ethics Committee on Animal Use, resolution 545.

We used 65 9-week-old male Wistar rats (*Rattus norvegicus Albinus*) that weighed approximately 300-350 grams each and were supplied and maintained in PUCPR's vivarium. The animals were kept in metal cages at temperatures between 19°C and 22°C with a photoperiod of 12 hours of light and 12 hours of darkness to avoid changes in their metabolic cycles. They were provided with water and food pellets *ad libitum*. The animals were randomly divided into three groups:

Control Group (C) was composed of 30 animals that were sacrificed after 1, 2, 3, 5, 7 or 14 days of experimentally induced tooth movement (100 cN). Five animals were observed at each time point.

Experimental Group (E) was composed of 30 animals that were sacrificed after 1, 2, 3, 5, 7 or 14 days of experimentally induced tooth movement (100 cN) under the action of Saizen® (1.33 mg (4 IU) - 0.035 mg/kg/day), which was administered 30 days before the application of force until the day of death. Five animals were observed at each time point.

Saizen® Group (SA) was composed of five animals that were sacrificed after 30 days under the administration of Saizen® (1.33 mg (4 IU) - 0.035

mg/kg/day) to characterize the periodontal ligament treated with mouse growth hormone but no orthodontic force.

Experiment (Figure 2, page 56)

The synthetic growth hormone used was Saizen[®] (1.33 mg (4IU) - Serono Prods. Farms. Ltda. - Somatropin (r-hGH) (Lot Y06A1957, manufactured: 02/09; validity: 02/10; Registry 1.1124.0184; Laboratoires Serono, Aubonne, Switzerland)). The dosage used was 0.035 mg/kg/day (Allen *et al.*, 1998) and was always administered in the morning subcutaneously in the abdominal region, alternating between the right and left sides.

To assess the tissue reactions to experimentally induced tooth movement over time, we applied force by means of an orthodontic appliance built from the model proposed by Heller and Nanda (1979), which consisted of a closed spring of nickel titanium (G & H Wire[®]) and stainless steel tying wire (0.0020 inches) used to fix the spring to the upper right first molar and upper incisors. The 100-cN force produced by the spring was standardized with a previously calibrated device. Once activated, the unit was not reactivated during the experimental period, although its position was checked daily.

To install the braces, the animals were sedated with the anesthetic tiletamine/zolazepam (50 Zoletil[®]; Brazil Industria e Comercio Ltda, São Paulo-SP, Virbac) at a dose of 50 mg/kg body weight and average volume of 0.25 ml/animal. This substance was injected into the quadriceps muscle of the left leg.

The animals were killed with an overdose of the anesthetic tiletamine/zolazepam (Zoletil 50[®]; Brazil Industria e Comercio Ltda, São Paulo-SP, Virbac), which was administered intraperitoneally. After dissection and excision of

the first right upper molar, the samples were fixed in 10% buffered formalin for 72 hours and demineralized in a 4.13% EDTA solution for approximately 12 weeks. Demineralization was obtained with transverse cuts to the cervical region of the tooth. The sections were stained with Lison and Harris' hematoxylin-eosin (HE).

Microscopic Analysis and Morphometry

In our qualitative analysis, we observed the arrangement of collagen fibers (CF), fibroblast (FB) morphology and the presence of root resorption (RR) in the periodontal ligament (LP) of the intermediate vestibular root and verified the presence of hyaline areas (HA) in all roots of an upper right molar.

Quantitative analysis was performed to recognize and quantify osteoclasts (OC), Howship *lacunae* (HL) and blood vessels (BV) present in the areas of tension and compression of the LP intermediate vestibular root of the first upper right molar, which were counted manually.

The histological criterion used to identify osteoclasts was the presence of eosinophilic and multinucleated cells adjacent to the surface of the alveolar bone (Arias and Marquez-Orosco, 2006). The slides were examined under light microscopy at 400X magnification. A single blinded observer who was unaware of the group to which each slide belonged performed the analysis.

Statistical Analysis

To compare groups, we applied the ANOVA test followed by the Games-Howell multiple comparison test for heterogeneous variances. To check whether there was a correlation between OC and HL, we used the Pearson correlation coefficient.

RESULT

QUALITATIVE ANALYSIS

Control Group (C), with only orthodontic movement:

On the first day, throughout the entire length of the LP, there were disorganized bundles of CF on the compression side, with a predominance of rounded FB. On the tension side, the fibers were more organized; they were stretched and parallel to each other, with a predominance of spindle FB. Small quantities of VS were observed; these were compressed on the compression side and dilated on the tension side. The presence of RR was also verified (Fig. 3 A and B, page 65).

On day 2, no change was observed (Fig. 3 C and D, page 65). From day 3, the CF became more disorganized on the compression side, and the numbers of OC and SV peaked (Fig. 3 E and F, page 65). The presence of RR was also noted. HL increased concomitantly with an increase in OC.

From the fifth day, there was a decrease in the number of OC and SV; however, RR was still present. Both variables decreased progressively until the 14th day. CF measurements remained the same, with the intensity of disorganization decreasing slightly (Fig. 4 G to L, page 66).

Experimental Group (E), administration of GH and orthodontic movement:

On the first and second days, CF on the compression side was disorganized with a predominance of rounded FB, while there were stretched FB spindles on the tension side. Experimental group measurements varied only in intensity. We observed small quantities of VS, which were compressed on the compression side and dilated on the tension side; RR was also detected (Figure 5 A to D, page 67).

The events described above intensified, with the highest number of OC observed on the third day (E3). HL increased concomitantly with an increase in OC (Figure 1 C and D, page 48).

From the 5th to the 14th day, the number of OC decreased sharply, as did the VS. Better organization of HR on the compression side was observed compared to group C. RR was also present, but with a lower frequency from the 7th to the 14th day (Figure 6 G through L, page 68).

SAIZEN Group (SA), administration of GH only:

In the SA group, organized CF was observed on the mesial and distal surfaces arranged in the periodontal ligament (PL), with a predominance of spindle FB. There were many VS, a few OC, and no HA, RR or cementoclasts (CC) (Figure 7, A and B, page 69).

QUANTITATIVE ANALYSIS

When analyzing the mean values of OC, HL and VS in the second group, regardless of time, the ANOVA test indicated statistically significant differences

($p < 0.05$) in the mean values of OC and VS. No statistically significant difference in HL was detected (Table 1, page 46).

At 1, 2, 5, 7 and 14 days after induction of tooth movement, the multiple-comparisons Games-Howell test identified no statistically significant difference ($p > 0.05$) between groups C and E with regard to OC, HL and VS (Table 3, page 64).

Comparing groups C and E on the 3rd day, group E had the greatest number of OC and SV compared to the control group ($p < 0.05$) (Table 1, page 46, Chart 1, page 60, and Chart 3, page 62).

The Pearson correlation test showed a strong positive correlation between OC and HL (0.68772); it was observed that as the number of OC increased, there was also an increase in the number of HL (Table 2, page 47; Chart 4, page 42).

DISCUSSION

The application of force on a tooth produces tissue reactions that are associated with local factors related to teeth and occlusion, as well as systemic factors related to bone metabolism (Verna and Melsen, 2003). Studies have shown that some hormones may affect this metabolism. Estrogen hormones appear to decrease bone resorption (Tyrovola and Spyropoulos, 2001), and administration of a continuous infusion of PTH accelerates tooth movement in rats (Soma et al., 1999; Soma et al., 2000).

Some studies have shown that GH participates in bone remodeling by stimulating osteoblasts (Tanaka and Seino, 1996) and osteoclasts (Nishiyama et al., 1996) during apposition and resorption, respectively. In the rat periodontal ligament, GH itself does not seem to be able to generate cellular changes; as in the present study, histological sections of the SA group had characteristics similar to normal PL. It is suggested, therefore, that the observed changes in PL in group E in the present study were due to both force and GH.

In groups C and E, during early periods of tooth movement, we observed inflammatory phenomena arising from high-magnitude biomechanical forces, such as those used in this study, on the tension and compression sides of the LP. In agreement with Macapanpan and Weinmann (1954), KUFTINEC (1968), Heller and Nanda (1979), Hamaya et al. (2002), Mabuchi et al. (2002) and Talic et al. (2003), there were disturbances in blood flow, necrosis, apoptosis, phagocytosis of cellular debris, hyalinization of tissue and a narrowing of the width of the LP and bone resorption in the vicinity of hyalinized areas of multinucleated OC associated with HL when excessive force was applied to the LP.

Areas of hyalinization were observed in all study periods in both groups with tooth movement (C and E), mainly on the compression side. These areas are characterized by the absence of cells, which have lost viability and have become necrotic (Kvam, 1972). On the third day, we observed more segments of tissue without cells or functioning vessels, which should have been present, to provide for the resorption of alveolar bone cortex (frontal) through the periodontal surface; without this condition, all cellular stress events and inflammation occurred at a distance from the desired location (Consolaro, 2002).

Similarly, experiments with induced tooth movement by Reitan et al. (1971) showed AH and lacunae of resorption containing OC on alveolar surfaces adjacent to hyaline areas on the compression side of the periodontal ligament. According to Ren et al. (2002), the AH observed at various times of tooth movement are compatible with forces of a magnitude similar to those used in this study.

AH was also observed on the tension sides of groups C and E, but to a lesser extent in the group C. According to Buckley (1990), if the forces are of high magnitude, areas of bone resorption can be viewed even on the tension side, as there is an excessive increase in the level of local chemical mediators and phenomena common to areas of compression.

In addition, excessive compression on LP causes RR, in which all events of cellular stress and inflammation occur at a distance (Reitan, 1959), as seen in this study. This type of resorption is undesirable because as it occurs and approaches the cortical bone, extensive bone destruction sets in, often leaving sequelae, such as lowering of the alveolar bone crest. Moreover, it causes pain and discomfort because the movement occurs abruptly and intensely rather than in a controlled manner (Consolaro, 2002). Similar AH and RR were observed in groups C and E, so excessive force rather than GH appears to be the cause.

Moreover, the greater number of osteoclasts on the third day in group E compared to group C probably occurred due to the influence of GH. This hormone acts directly on osteoblast proliferation and differentiation (Tresguerres, et al., 2005), stimulating bone turnover and increased protein synthesis and mineralization (Marcus, 1997) and, more specifically, synthesis of the bone matrix proteins (Tresguerres et al., 2005). Our results agree with those of Tresguerres et

al. (2005), as we noted an increase in bone resorption after one week of local application of 1.2 mg of GH in peri-implant tissue in rabbits. Ribeiro (2008) directed tooth movement in rats in which GH was being administered and also noted that GH accelerated and increased bone resorption and caused a delay in the formation of immature collagen. However, that study did not assess the effect of chronic GH, only its administration during the course of orthodontic movement.

There was an increase in the number of VS in groups C and E during the initial period of induced tooth movement. According to Toms et al. (2000), vascular proliferation was observed in the PL of teeth that have been orthodontically moved, promoting the regenerative processes characteristic of this region as an important mediator of bone remodeling. However, there was a greater increase in the number of SV in group E compared to group C, which is probably due to the presence of GH. There have been few studies clarifying whether GH modulates angiogenesis, but there is evidence that when there is a deficiency or excess of GH, vascular function can be modified (Ashlar et al., 2005).

With increased angiogenesis, as observed in our results, GH can cause a biphasic effect, concurrently with the activation of bone resorption and subsequent activation of neoformation (Danahue and Rosen, 1999; Ackert-Bicknell et al., 2002). An assessment of bone formation, however, was not the objective of this study.

These results suggest that GH, when associated with tooth movement induced by high-magnitude force, has the power to stimulate bone resorption. Therefore, individuals undergoing orthodontic treatment who use GH require

longer intervals between applications of orthodontic force and an applied force of decreased magnitude because the bone resorption process is more intense. Radiographic control should be used frequently to assess the pattern of bone resorption.

CONCLUSION

Chronic use of growth hormone associated with high-magnitude force causes intensified bone resorption during induced tooth movement in Wistar rats.

- 1- Ackert-Bicknell C, Rubin J, Zhu L, et al. IGF-I Acts as a coupling factor for bone remodeling by regulating osteoprotegerin and RANK ligand in vitro and osteoprotogerin in vivo. 84th annual meeting of the endocrine society. San Francisco, CA; 2002:3-366.
- 2- Allen DB. Growth Hormone Therapy For Short Stature: Is The Benefit Worth The Burden? Pediatrics 2006;118:343-348.
- 3- Arias OR, Marquez-Orosco MC. Aspirin, acetaminophen, and ibuprofen: their effects on orthodontic tooth movement. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2006; 130 (3):364-370.
- 4- Buckley MJ, Banes AJ, Jordan RD. The effects of mechanical strain on osteoblasts in vitro. J Oral Maxillofac Surg 1972;5(3):507-516.
- 5- Brixen K, Nielsen HK, Mosekilde L, et al. A short course of recombinant human growth hormone treatment stimulates osteoblasts and activates bone remodeling in normal human volunteers. J Bone Miner Res 1990; 5(6): 609-18.
- 6- Carrol PV, Christ ER, Bengtsson BA, et al. Growth hormone deficiency in adulthood and the effects of growth hormone replacement: a review. J Clinical Endocrinol Metab 1998; 83(2): 382-395.
- 7- Induced tooth movement: biology applied to clinical practice. In: A. Consolaro Dental Resorption in clinics specialties.Clínicas. Maringá: Dental Press 2002:221-57.

- 8- Danahue LR, Rosen CJ. Growth Hormone and Insulin-like growth factor I as therapeutic modalities for age related osteoporosis. In: Rosen CJ, Glowacki J, Bilezikian JP. The aging skeleton. San Diego: Academic Press, 1999. P. 579-84.
- 9- Dudic A, Kiliaridis S, Mombelli A, et al. Composition changes in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: comparisons between tension and compression sides. Eur J Oral Sci 2006; 114(5): 416-22.
- 10- Ehrnbor C, Rósen T. Physiological and pharmacological basis for the ergogenic effects of growth hormone in elite sports. Asian J Androl 2008; 10(3): 373-383.
- 11- Fontes EM. Métodos de eutanásia. Rev Port Cien Vet 1955; 40:104-9.
- 12- Gameiro H, Nouer DF, Magnani MBBA, et al. Evaluation of root resorption associated with orthodontic movement in stressed rats. Minerva Stomatol 2008, 57:569-575.
- 13- Hamaya M, Mizoguchi I, Sakakura Y, et al. Cell death of osteocytes occurs in rat alveolar bone during experimental tooth movement. Calcif Tissue Int 2002; 70(2):117-26.
- 14- Heller IJ, Nanda R. Effect of metabolic alteration of periodontal fibers on orthodontic tooth movement. An experimental study. Am J Orthod 1979; 75(3): 239-58.
- 15- Kuftinec MM. Vascular changes due to the application of force to the molar teeth in hamsters. J Dent Res 1968; 47(6): 916-8.

- 16- Kvam, E. Cellular dynamics on the pressure side of the rat periodontium following experimental tooth movement. *Scand. J. Dent. Res.*, 1972; 80(5):369-383.
- 17- Mabuchi R, Matsuzaka K, Shimono M, et al. Cell proliferation and cell death in periodontal ligaments during orthodontic tooth movement. *J Periodontal Res* 2002; 37(2): 118-24.
- 18- Macapanpan LC, Weinmann JP. The influence of injury to the periodontal membrane on the spread of gingival inflammation. *J Dent Res* 1954; 33(2): 263-72.
- 19- Marcus R. Skeletal effects of growth hormone and IGF-I in adults. *Horm Res* 1997; 48(suppl 5): 60-64.
- 20- Nishiyama K, Sugimoto T, Kaji H, et al. Stimulatory effect of growth hormone on bone resorption and osteoclast differentiation 1996; 137(1):35-41.
- 21- O'Halloran DJ, Tsatsoulis A, Whitehouse RW, et al. Increased bone density after recombinant human growth hormone (GH) therapy in adults with isolated GH deficiency. *J Clin Endocrin Metab* 1993; 76(5): 1344-8.
- 22- Pape GS, Friedman M, Underwood LE, et al. The effect of growth hormone on weight gain and disease pulmonary function in patients with chronic obstructive lung disease 1991; 99(6):1495-1500.
- 23- Reitan RM. The comparative effects of brain damage on the Halstead impairment index and the Wechsler-Bellevue scale. *J Clin Psychol* 1959; 15(3):281-5.

- 24- Reitan K, Kvam E. Comparative behavior of human and animal tissue during experimental tooth movement. *Angle Orthod* 1971;41(1):1-14.
- 25- Ren Y, Maltha JC, Van't Hof MA, et al. Cytokine levels in crevicular fluid are less responsive to orthodontic force in adults than in juveniles. *J Clin Periodontol* 2002; 29(8):757-62.
- 26- Ribeiro JS. Effect of growth hormone on induced tooth movement. Master Thesis in Orthodontics. Pontifical Catholic University of Paraná . 2008:50.
- 27- Rudman D, Feller AG, Nagraj HS, et al. Effects of human growth hormone in men over 60 years old. *N Engl J Med* 1990; 323(1):1-6.
- 28- Russell SM, Spencer EM. Local injections of human or rat growth hormone or of purified human somatomedin-C stimulate unilateral tibial epiphyseal growth in hypophysectomized rats. *Endocrin* 1985; 116(6): 2563-7.
- 29- Silha JV, Krsek M, Hana V, et al. The effects of growth hormone status on circulating levels of vascular growth factors. *Clin Endocrin* 2005;63:79-86.
- 30- Simpson H, Savine R, Sonksen P, et al. Growth hormone replacement therapy for adults: Into de new millennium. *Growth Horm & IGF Res* 2002; 12(1): 1-33.
- 31- Soma S, Iwamoto M, Higuchi Y, et al. Effects of continuous infusion of PTH on experimental tooth movement in rats. *J Bone Miner Res* 1999; 14(4): 547-554.
- 32- Soma S, Matsumoto S, Higuchi Y, et al. Local and chronic application of PTH accelerates tooth movement in rats. *J Dent Res* 2000; 79(9): 1717-1724.

- 33- Shirazi M, Nilforoushan D, Alghasi H, et al. The role of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. *Angle Orthod.* 2002; 72(3):211-5.
- 34- Swolin-Eide D, Nilsson A, Ohlsson C, et al. Cortisol increases growth hormone-receptor expression in human osteoblast-like cells. *J Endocrinol* 1998; 156(1) p.99-105.
- 35- Talic NF, Evans CA, Daniel JC, et al. Proliferation of epithelial rests of Malassez during experimental tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2003; 123(5): 527-33.
- 36- Tanaka H, Seino Y. Does growth hormone treatment prevent corticosteroid-induced osteoporosis? *Bone* 1996; 18(6): 493-4.
- 37- Toms A, Gannon B, Carati C. The immunohistochemical response of the rat periodontal ligament endothelium to an inflammatory stimulus. *Austr Orthod J* 2000; 16(2): 61-68.
- 38- Tresguerres IF, Alobera MA, Baca R, et al. Histologic, morphometric, and densitometric study of peri-implant bone in rabbits with local administration of growth hormone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005; 20(2): 193-202.
- 39- Tyrovola JB, Spyropoulos MN. Effects of drugs and systemic factors on orthodontic treatment. *Quintessence Int* 2001; 28(5): 365-371.
- 40- Verna C, Melsen B. Tissue reaction to orthodontic tooth movement in different bone turnover conditions. *Orthod Craniofac Res* 2003; 6(3): 155-63.

TABLES

TABLE 1 - Descriptive Statistics for all Variables in Accordance with Time and the Games-Howell Intergroup Multiple Comparison Test during the Same Observation Period.

Variable	Day	Control Group (n=5)			Experimental Group (n=5)			P-value
		Average	Median	D	Average	Median	D	
Osteoclasts	1	4	4	0.71	5.6	5	2.19	0.87193
	2	9.2	9	6.38	12.6	12	2.07	0.97466
	3	9.8	9	2.59	21	21	1.22	*0.00303
	5	5	4	2.35	7.6	6	3.58	0.94051
	7	4.2	4	0.84	5.4	5	2.7	0.99194
	14	2.4	2	0.55	3.8	4	0.84	0.23785
Howship								
Lacunae	1	4.8	5	0.45	4.2	4	1.3	0.99069
	2	6.6	4	4.62	6.8	5	4.49	1
	3	9.6	9	0.89	8.8	8	1.92	0.99718
	5	5	5	0.71	5.4	5	1.14	0.99968
	7	4.6	5	1.14	4	3	1.41	0.99933
	14	3.2	3	0.45	3	3	0	0.9865
Blood								
Vessels	1	5.8	6	0.45	8	7	2	0.52446
	2	3.4	4	1.95	5	5	1.87	0.95171
	3	4.8	5	1.64	9.4	9	0.55	*0.03024
	5	4.2	4	1.3	5.2	5	0.45	0.84796
	7	4.6	5	1.67	5	5	0.71	0.99997
	14	3.2	2	1.79	4.2	4	1.3	0.99138

Source: PUCPR

Legend: SD - standard deviation

Note: * Statistically significant ($p < 0.05$).

TABLE 2 - Pearson Correlation Test of the Examined Variables.

Variable	Osteoclasts n=60	Howship Lacunae n=60	Blood vessels n=60
Osteoclasts	1	0.68772 p< 0,0001*	0.47648 p< 0,0001*
Howship lacunae	0.68772 p< 0,0001*	1	0.27740039 0.031885645
Blood vessels	0.47648 p< 0,0001*	0.27740 p< 0,0001*	1

Source: PUCPR

Note: * Statistically significant (p <0.05).

FIGURES

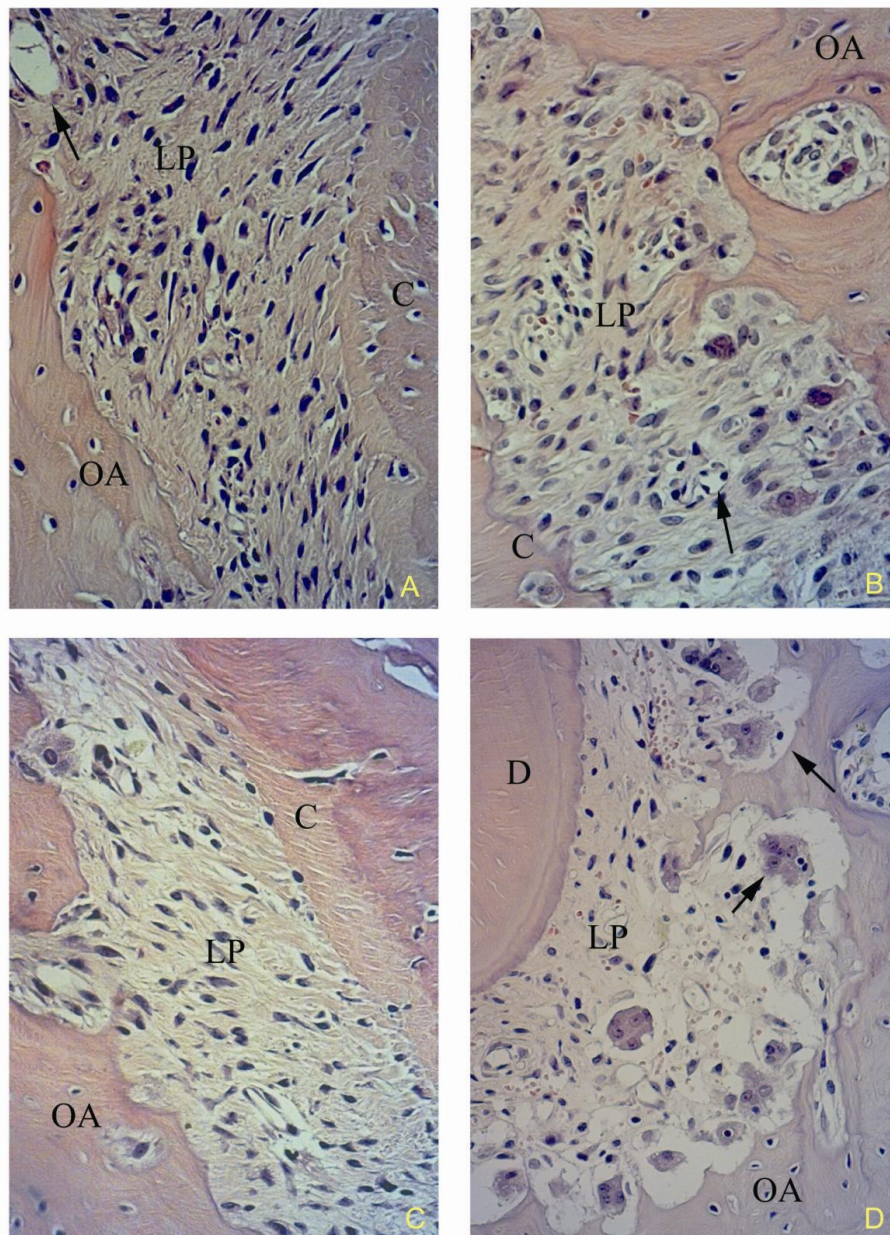


Figure 1 - Photomicrographs (200X magnification) of control group, day 3, tension side (A) and compression side (B) Experimental group, day 3, tension side (C) and compression side (D). Cementum (C), dentine (D), alveolar bone (AB), periodontal ligament (LP), blood vessel (SV), osteoclast (OC). Arrows in A and B indicate blood vessels. In D, arrows indicate osteoclasts within Howship lacunae.

3- ANEXOS

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
NÚCLEO DE BIOÉTICA
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Curitiba, 10 de junho de 2010.

REGISTRO DO PROJETO NO CEUA: 545 – 1ª versão

TÍTULO DO PROJETO:

Efeito do hormônio de crescimento no dente e ligamento periodontal submetidos à força ortodôntica "pesada".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Elisa Souza Camargo

EQUIPE DA PESQUISA:

Elisa Souza Camargo, Cristina Hepp, Denise Odete Manarelli

INSTITUIÇÃO:

PUCPR

CATEGORIA DO EXPERIMENTO – CATEGORIA C

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE E/OU PESO	QUANTIDADE
<i>Rattus norvegicus albinus</i>	Macho	3 meses, 300 a 350g	79

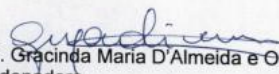
O colegiado do CEUA em reunião no dia 10/06/2010, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

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.

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

Atenciosamente,


Prof.ª Gracinda Maria D'Almeida e Oliveira
Coordenadora
Comitê de Ética no Uso de Animais - PUCPR



ANEXO 2 – MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi submetido à apreciação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) sob registro nº545.

Seleção da Amostra

A amostra foi constituída por 65 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) com 9 semanas de vida, pesando aproximadamente entre 300 e 350g, provenientes do Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR).

O método experimental e todos os experimentos realizados obedeceram às recomendações éticas, legais e de biossegurança especificadas para a experimentação animal (Rowsell, 1986¹). Animais machos foram usados para eliminar qualquer variabilidade hormonal devido ao ciclo reprodutivo da fêmea. O período de aclimação não foi necessário devido ao nascimento e ao experimento serem realizados no mesmo ambiente (Biotério PUCPR).

Acondicionamento da Amostra

Durante o período experimental os animais permaneceram no Biotério da PUCPR e foram acondicionados em gaiolas contendo 3 animais em cada. A gaiola-viveiro foi constituída de caixas de propileno semi-fosco com locais

¹ Rowsell, H.C. (1986) *Acta Physiol Scand Suppl*, 554, 95-105.

específicos para colocação de alimento e água. Durante todo o experimento, as gaiolas permaneceram forradas com cepilho (*maravalha de pinus*), com a finalidade de absorver a urina dos animais e a água derramada no seu interior, manter o fundo sempre seco, e servir de isolante térmico, a fim de reduzir a condução de calor do corpo dos animais.

As raspas de madeira foram substituídas diariamente para evitar o acúmulo de gases tóxicos (amônia e sulfeto de hidrogênio) resultantes da degradação oxidativa e bacteriana dos excrementos, oferecendo assim, condições favoráveis de higiene, conforto e bem-estar (Baker, Lindsey e Weisbroth, 1979²).

Foram utilizados dispensadores de vidro para água, com bico de aço inoxidável, com capacidade para 500ml, disponíveis permanentemente na gaiola para garantir suprimento constante de água mineral aos animais.

Para diminuir a possibilidade de danificação ou remoção do acessório ortodôntico que será posteriormente descrito, inicialmente a ração comercial (Labina - Purina) foi picada aos poucos até que os animais se acostumassem a comê-la triturada. Esta ração foi amolecida com água e fornecida aos animais *ad libitum* e trocada diariamente para evitar a formação e proliferação de fungos por exposição prolongada do alimento. Os ratos permaneceram em local com iluminação natural e temperatura ambiente, apresentando-se limpo e arejado. O uso de substâncias desodorizantes ou desinfetantes foi evitado para não causar qualquer interferência no experimento (Baker, Lindsey e Weisbroth, 1979²).

² Baker, D.E.J.; Lindsey, J.R.; Weisbroth, S.H. (1979) *The Laboratory Rat*, Academic Press, New York, p.169-192.

Foi realizado controle de fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro para evitar alterações no ciclo metabólico (Yamauchi et al., 1981³). Cada animal recebeu uma identificação para atender os objetivos dos autores. Com o objetivo de observar alterações de peso e para o cálculo e ajustes das dosagens da medicação que foi administrada, os animais foram pesados no início da pesquisa e diariamente, até sua conclusão com auxílio de balança eletrônica de precisão (Gehaka – BG 4001).

Administração da Droga

O fármaco utilizado foi SAIZEN® 1,33 mg (4UI) - Serono Prods. Farms. Ltda. – Somatropina (r-hGH) - (Lote Y06A1957, Fabricação: 02/09, Validade: 02/10, Registro 1.1124.0184, Laboratoires Serono, Aubonne, Suisse).

Foram realizadas aplicações diárias de 0,035mg kg/dia (Bouillon; Prodonova, 2000⁴; Mac Gillivray et al., 1998⁵), via subcutânea na região abdominal alternando entre os lados direito e esquerdo, iniciando 30 dias antes da instalação do acessório ortodôntico, sempre no mesmo horário. A administração do medicamento foi realizada de forma cautelosa para que não causasse nenhum tipo de dor ou sofrimento aos animais.

³ Yamauchi, C.; Fujita, S.; Obara, T.; Ueda T. (1981) *Lab. Anim. Sci.*, **31**(3),251-8.

⁴ Bouillon, R.; Prodonova, A. (2000) *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* **13**(Suppl 6),1327-36.

⁵ Mac Gillivray, M.H.; Blethen, S.L.; Buchlis, J.G. et al. (1998) *Pediatrics*, **102**(2), 527-530.

Distribuição da Amostra

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos, controle (C), experimental (E) e Saizen (SA). Os grupos C e E tiveram a finalidade de caracterizar a evolução do movimento dentário induzido ao longo do tempo e o grupo SA de avaliar o efeito do HC no ligamento periodontal dos ratos. O grupo de dentes estudado foi composto pelos primeiros molares superiores do lado direito.

Grupo Controle: Contendo trinta animais mortos após um, dois, três, cinco, sete e catorze dias de movimento dentário induzido.

Grupo Experimental: Contendo trinta animais mortos após um, dois, três, cinco, sete e catorze dias de movimento dentário induzido, sob administração de SAIZEN® 1,33 mg (4UI) -0,035mg kg/dia.

Grupo SA: Contendo cinco animais mortos após trinta dias, sob administração de SAIZEN® 1,33 mg (4UI) -0,035mg kg/dia, para caracterizar o ligamento periodontal do rato apenas com o hormônio de crescimento.

Preparo do Acessório Ortodôntico

O acessório ortodôntico foi construído a partir do modelo proposto por Heller e Nanda (1979)⁶ e consistiu em uma mola de níquel-titânio fechada de 9mm (G&H® Wire Company) e fio de amarelo de aço inoxidável com 0,0020 polegada, para fixação da mola no primeiro molar e nos incisivos superiores.

⁶ Heller, I.J.; Nanda, R. (1979) *Am. J. Orthod.* 75(3), 239-258.

Anestesia dos Animais para Instalação do Dispositivo Ortodôntico

Para o procedimento de instalação do dispositivo ortodôntico os animais foram sedados com Tiletamina/Zolazepam (Zoletil®, Virbac), na dosagem de 50mg/kg de peso corporal e média de volume de 0,25 ml/animal. Esta substância foi injetada no músculo quadríceps do membro inferior esquerdo.

Instalação e Ativação dos Dispositivos Ortodônticos

Após posicionar os animais em mesa operatória própria para contenção e abertura da boca dos animais, foi instalada uma mola espiralada ortodôntica, fechada, de 9mm, marca comercial Sentalloy (G&H® Wire Company REF CCOF9XL Lote 103946 Hanover, Germany) que produziu uma força no sentido distal dos incisivos superiores e mesial no primeiro molar superior direito. Para fixar esta mola ao primeiro molar, amarrilho de aço de 0,0020 polegada foi dobrado de maneira a adquirir a forma de anzol. Este foi inserido inicialmente por vestibular e pelo espaço interproximal entre os primeiros e segundos molares superiores direitos, prendendo uma extremidade da mola. Uma vez apreendida a ponta do fio por palatino do espaço interproximal com porta agulha *Mathieu*, a mola foi fixada amarrando-a de forma que ficou posicionada por mesial e o mais próximo possível da coroa do primeiro molar. O fio de amarrilho fez analogia a uma banda circundando a coroa do primeiro molar superior e ao mesmo tempo fixando uma das extremidades da mola. A outra extremidade foi unida aos incisivos superiores, por meio de fio de amarrilho 0,0020 polegada e resina composta. Para tanto, o esmalte foi condicionado com ácido ortofosfórico a 37% em gel por 15 segundos, em seguida a superfície foi lavada com água por 15

segundos e seca. O agente de união foi aplicado sobre a superfície condicionada do esmalte e fotopolimerizado com luz halógena por 20 segundos com auxílio do aparelho de fotopolimerização previamente calibrado. Força de 100cN produzida pela mola foi padronizada com um dispositivo previamente calibrado.

Após a ativação inicial, o dispositivo não foi reativado durante o período experimental, no entanto seu posicionamento foi conferido diariamente.

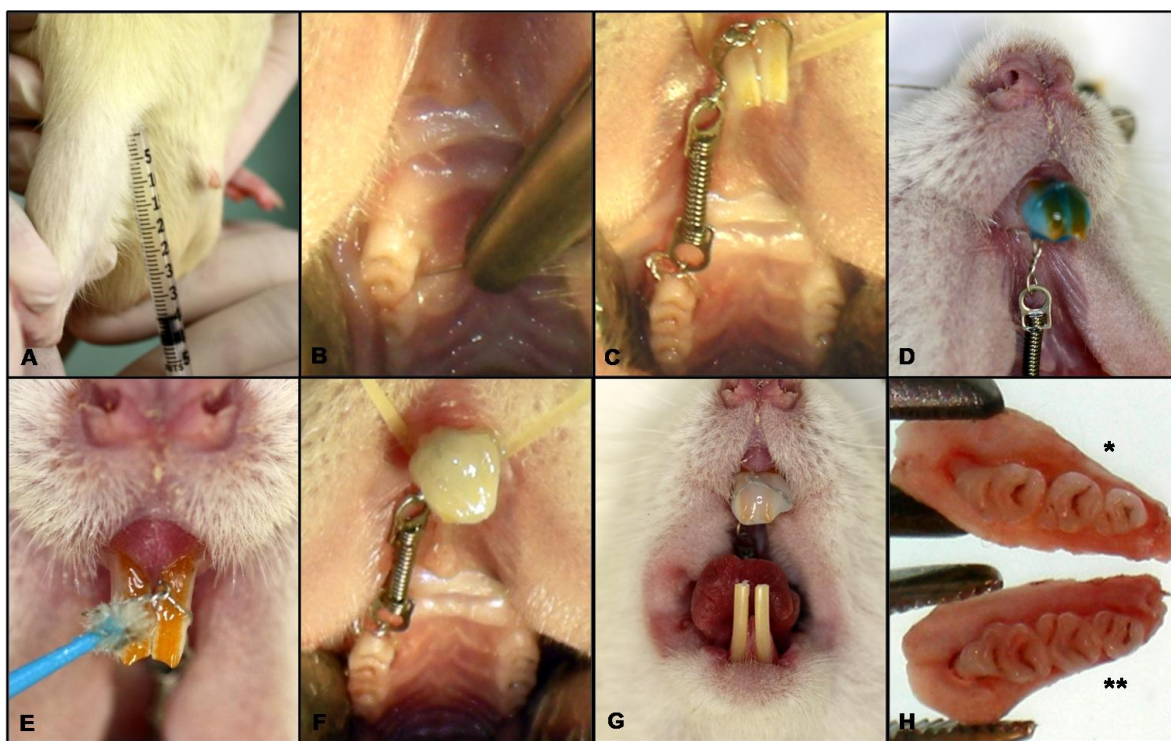


Figura 2 – Sequência de procedimentos para a instalação do dispositivo ortodôntico: Administração do Hormônio de crescimento (A); Inserção do fio de amarrilho de aço 0,020'' no espaço interproximal entre o primeiro e o segundo molar superior direitos (B); Fixação da mola, com o fio de amarrilho circundando a coroa do primeiro molar e a outra extremidade da mola nos incisivos superiores (C); Condicionamento ácido (D), adesivo (E) e resina composta (F) nos incisivos superiores; Dispositivo instalado (G); Hemi-maxila direita (*) e esquerda após dissecação (**) (H).

Morte dos animais, Obtenção e Preparo dos Espécimes

Os animais foram mortos por dose excessiva de solução anestésica Tiletamina/Zolazepam (Zoletil 50® do Brasil Indústria e Comércio Ltda, São Paulo- SP, Virbac), via intraperitoneal.

Após constatada a morte dos animais, suas cabeças foram dissecadas removendo-se os componentes de tecido mole com auxílio de lâmina de bisturi. As maxilas foram separadas dos crânios e as áreas de interesse imersas em solução de formalina 10% tamponada para fixação, por período de 72 horas. Após, os espécimes foram colocados em solução desmineralizante de etilenodiaminotetracetatodissódico (EDTA) a 4,13% por 12 semanas. A solução foi trocada diariamente até a amostra ser completamente descalcificada. Os procedimentos operatórios foram realizados na Técnica Operatória do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da PUCPR, sob condições de limpeza, anti-sepsia e desinfecção, com instrumentos esterilizados em autoclave.

Processamento Histotécnico

Após a desmineralização, os espécimes foram processados histologicamente no Laboratório de Patologia Experimental do CCBS da PUCPR. As peças foram lavadas em água corrente por um período de 12 horas e logo mergulhadas em álcool 70° GL. Posteriormente, as peças foram desidratadas em álcool 95° GL por 1 hora, em seguida por álcool absoluto por 1 hora, sendo trocada a solução e permanecendo por mais 2 horas. Concluída a desidratação, as amostras foram diafanizadas duas vezes em xilol por 30 minutos.

As peças foram incluídas em parafina histológica para que os cortes transversais, na região cervical, de 5µm de espessura pudessem ser realizados. Foram montados em lâminas de vidro para serem preparados e corados pelo método de hematoxilina-eosina de Harris e Lison. A montagem das lâminas se fez com lamínulas de vidro em Entellan. Após secagem as lâminas foram acondicionadas em caixas apropriadas, e armazenadas em ambiente seco e fresco.

Análise Microscópica e Morfometria

Utilizou-se o método de Hematoxilina-Eosina para reconhecer e quantificar o número de vasos sanguíneos, células osteoclásticas e lacunas de Howship presentes no ligamento periodontal.

Na análise qualitativa observou-se a disposição das fibras colágenas (FC), a morfologia dos fibroblastos (FB) e a presença de reabsorção solapante (RS) no ligamento periodontal (LP) da raiz intermediária vestibular e verificou-se a presença de áreas hialinas (AH) em todas as raízes do 1º molar superior direito.

A análise quantitativa foi realizada para reconhecer e quantificar os osteoclastos (OC), lacunas de *Howship* (LH) e vasos sanguíneos (VS) presentes nas áreas de tração e de compressão do LP da raiz intermediária vestibular do primeiro molar, os quais foram contados manualmente.

O critério histológico utilizado para identificar células osteoclásticas foi a presença de células eosinofílicas e multinucleadas adjacentes à superfície do osso alveolar (Arias and Márquez-Orosco, 2006) e as lacunas de Howship foram consideradas ativas quando estavam próximas às células osteoclásticas.

Essa análise foi realizada por um único operador devidamente calibrado que desconhecia o grupo a que cada lâmina pertencia.

ANEXO 3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

GRÁFICO 1- INTERVALO DE CONFIANÇA (95%) PARA A MÉDIA DE OC SEGUNDO GRUPO X TEMPO, PUCPR - 2010

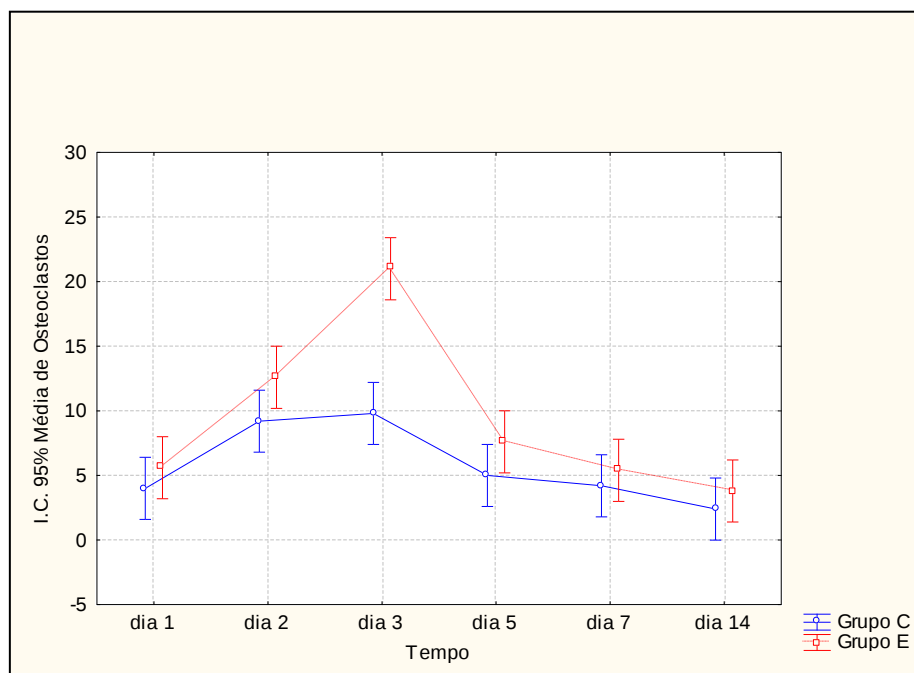


GRÁFICO 2- INTERVALO DE CONFIANÇA (95%) PARA A MÉDIA DE LH SEGUNDO GRUPO X TEMPO, PUCPR – 2010

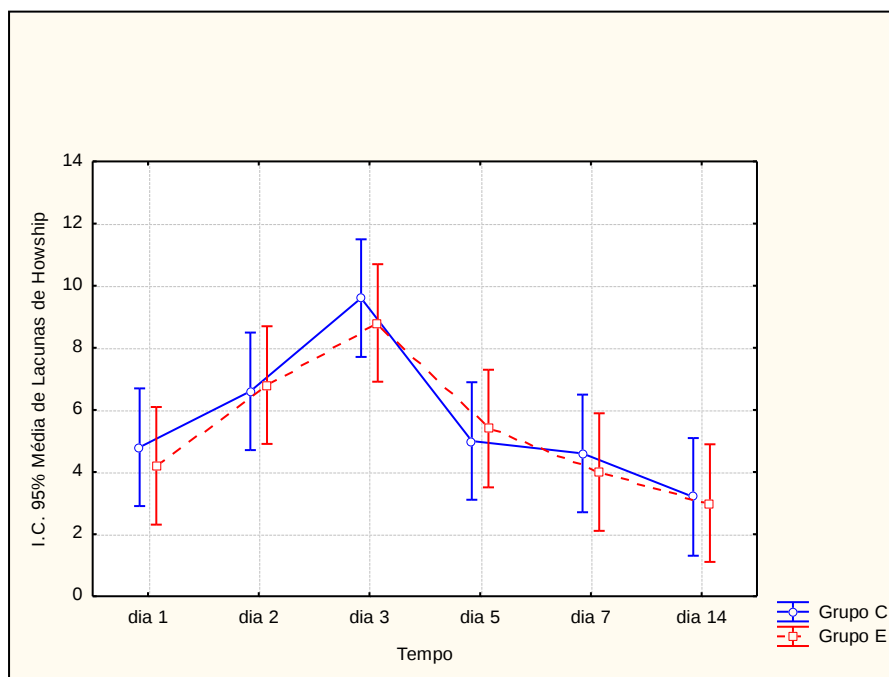


GRÁFICO 3- INTERVALO DE CONFIANÇA (95%) PARA A MÉDIA DE VS SEGUNDO GRUPO X TEMPO, PUCPR - 2010

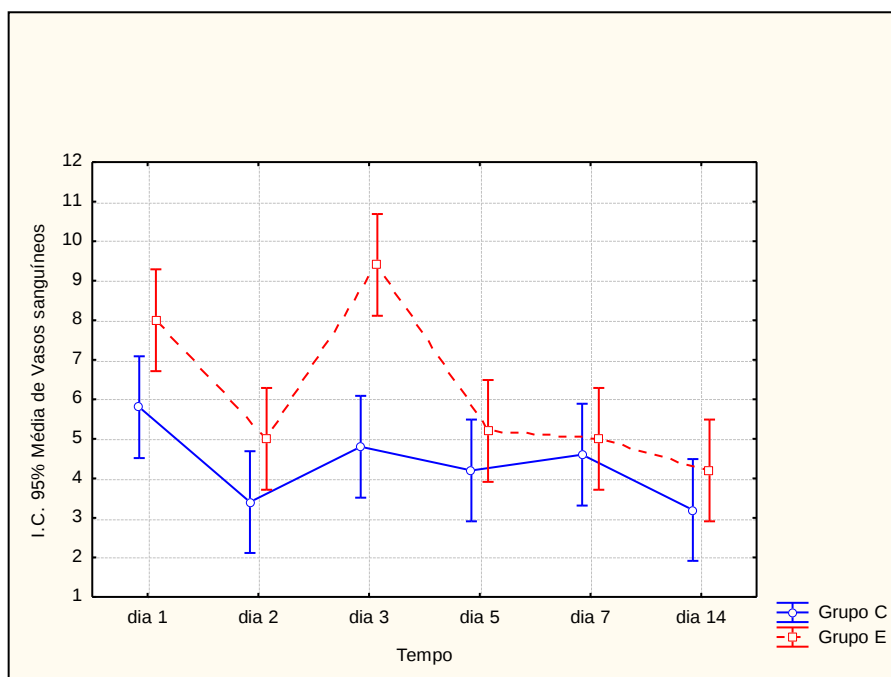


GRÁFICO 4- CORRELAÇÃO DE OC COM LH, TESTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON, PUCPR - 2010

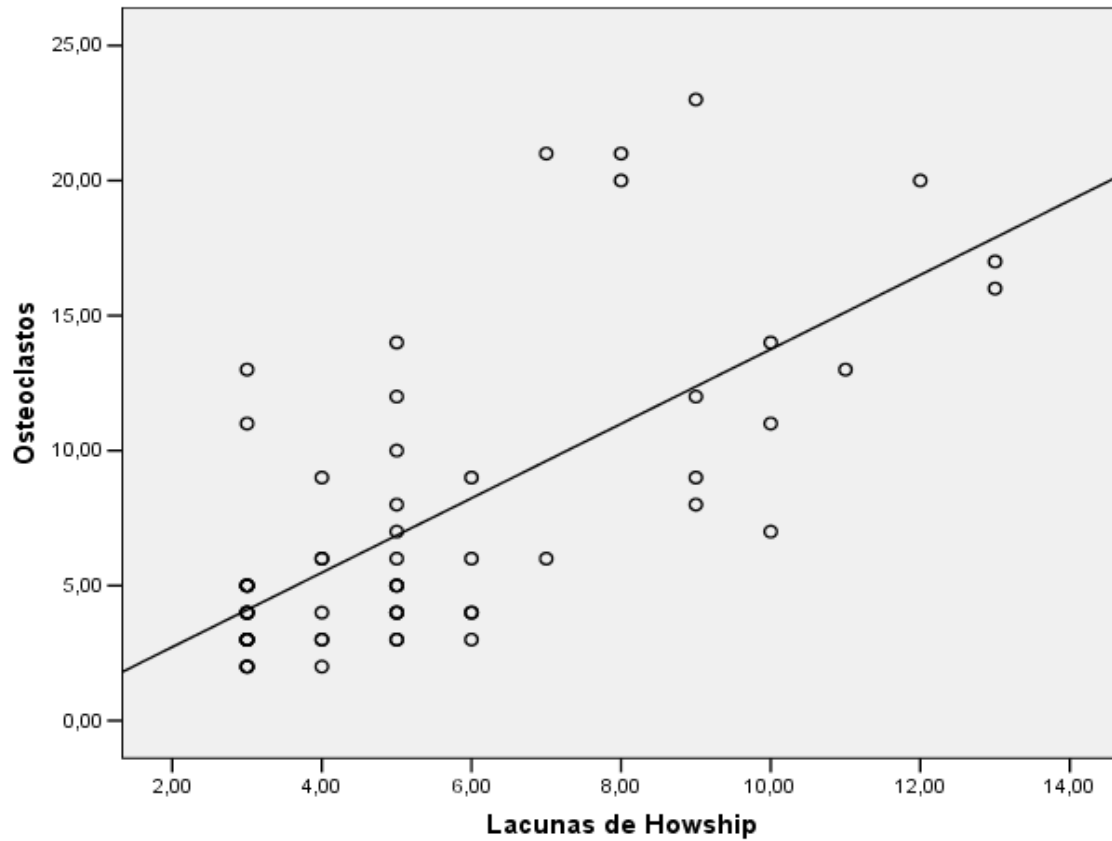


TABELA 3 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DE TODAS AS VARIÁVEIS DE ACORDO COM O GRUPO E TESTE DE GAMES-HOWELL DE COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS INTERGRUPOS E NO MESMO PERÍODO DE OBSERVAÇÃO, PUCPR - 2010

Variável	Grupo Controle (n=30)			Grupo Experimental (n=30)			Valor p
	Média	Mediana	D.P.	Média	Mediana	D.P.	
Osteoclastos	5,77	4	3,92	9,33	6	6,36	*0,00000
Lacunas de							
Howship	5,63	5	2,76	5,37	5	2,81	0,626
Vasos							
Sanguíneos	4,33	5	1,67	6,13	5	2,26	*0,000013

Fonte: Dados da pesquisa

Legenda: D.P. – Desvio Padrão

Nota: * Valores estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

ANEXO 4 - ILUSTRAÇÕES

Tração

Compressão

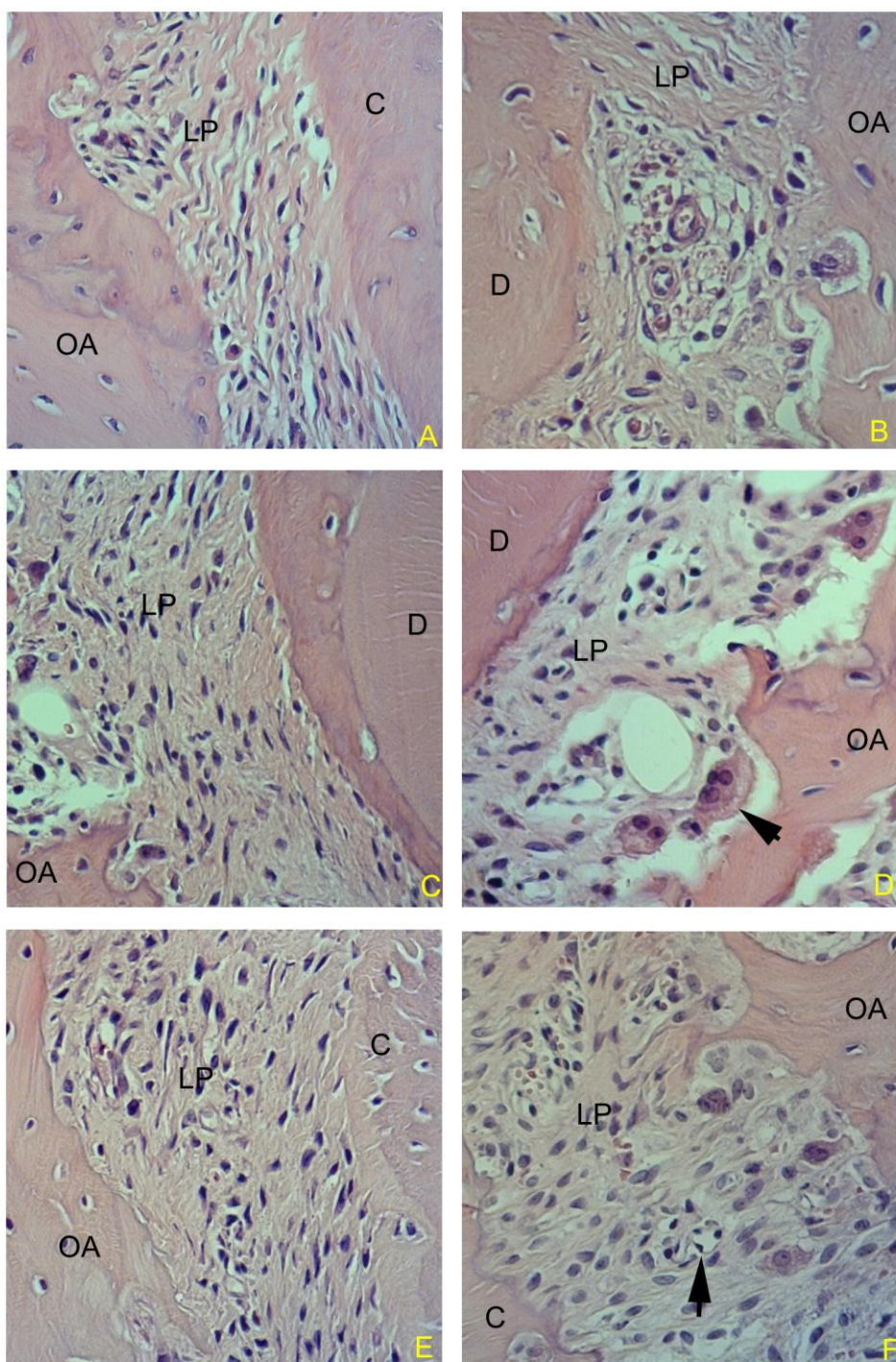


Figura 3 – Fotomicrografias (H.E. - 200x) do Grupo controle, 1º dia (A e B), 2º dia (C e D), 3º dia (E e F). Cimento (C), Dentina (D), Osso Alveolar (OA), Ligamento Periodontal (LP), Vaso Sanguíneo (VS), Osteoclasto (OC). Seta em D indica OC no interior da LH. Seta em F indica VS.

Tração

Compressão

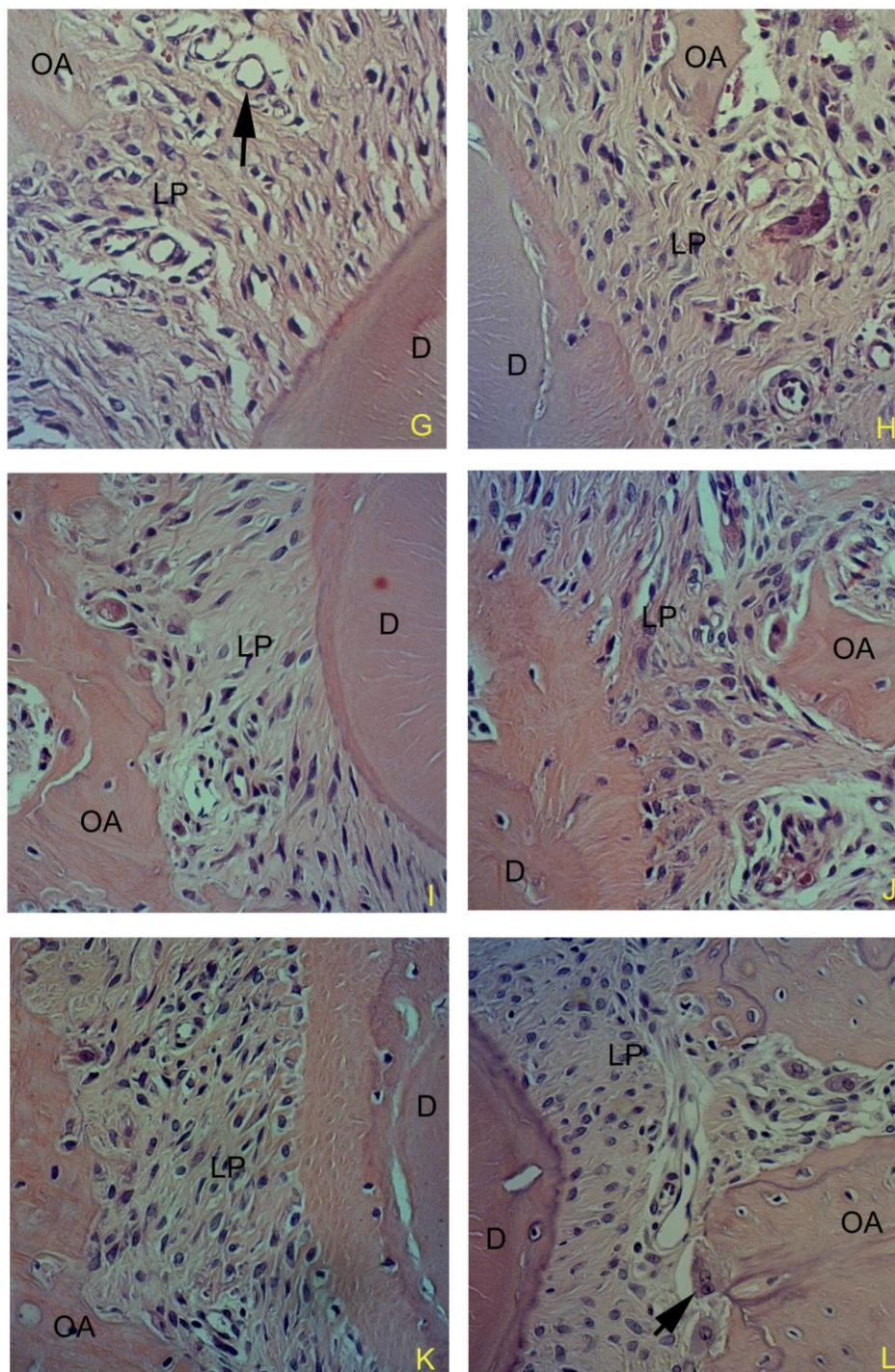


Figura 4 – Fotomicrografias (H.E. - 200x) do Grupo controle, 5° dia (G e H), 7° dia (I e J) e 14° dia (K e L). Dentina (D), Osso Alveolar (OA), Ligamento Periodontal (LP), Vaso Sanguíneo (VS), Osteoclasto (OC). Seta em G indica VS. Seta em L indica OC no interior de LH.

Tração

Compressão

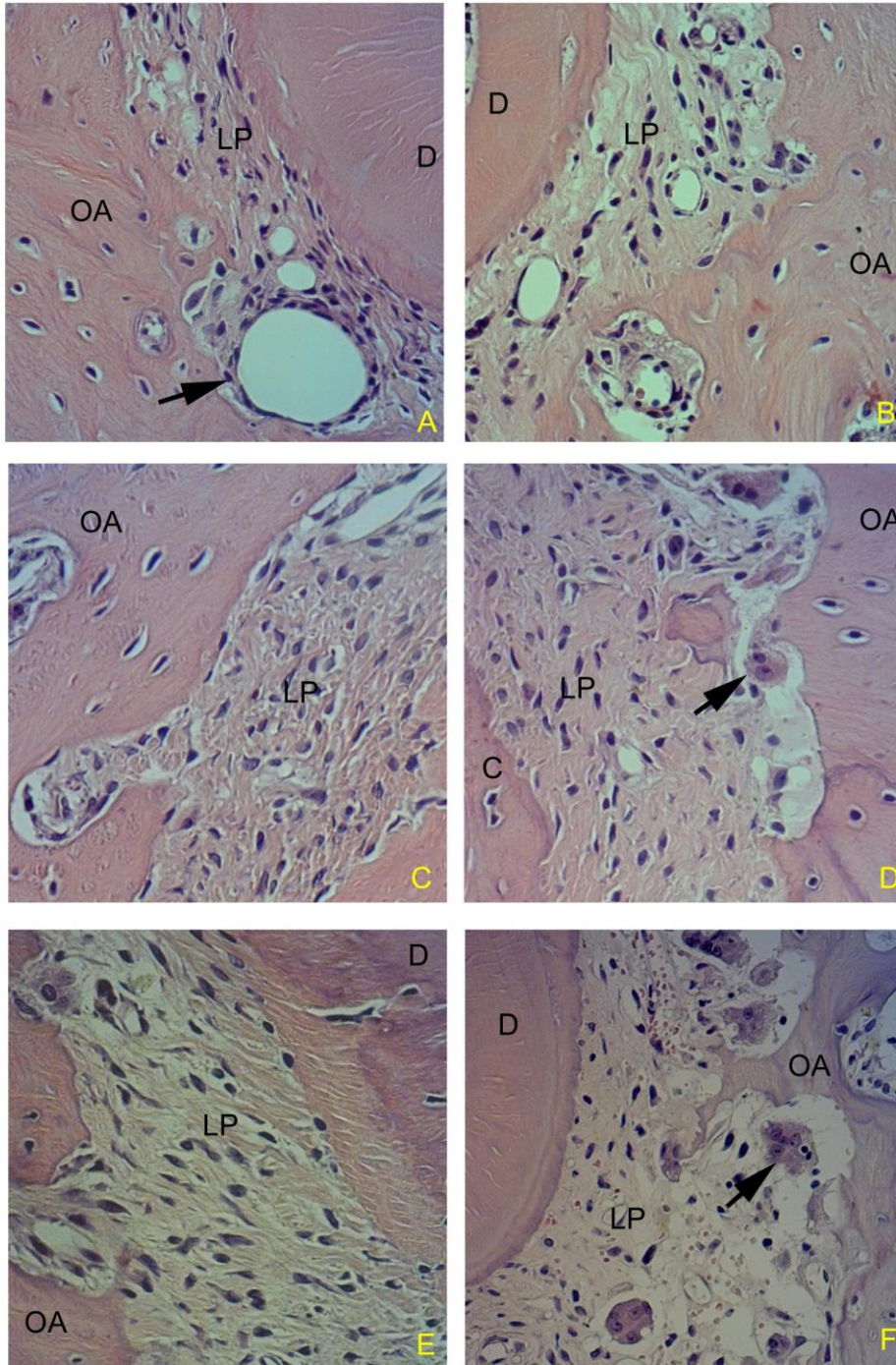


Figura 5 – Fotomicrografias (H.E. - 200x) do Grupo experimental, 1º dia (A e B), 2º dia (C e D), 3º dia (E e F). Cimento (C), Dentina (D), Osso Alveolar (OA), Ligamento Periodontal (LP), Vaso Sanguíneo (VS), Osteoclasto (OC). Seta em A indica VS. Setas em D e F indicam OC no interior da LH.

Tração

Compressão

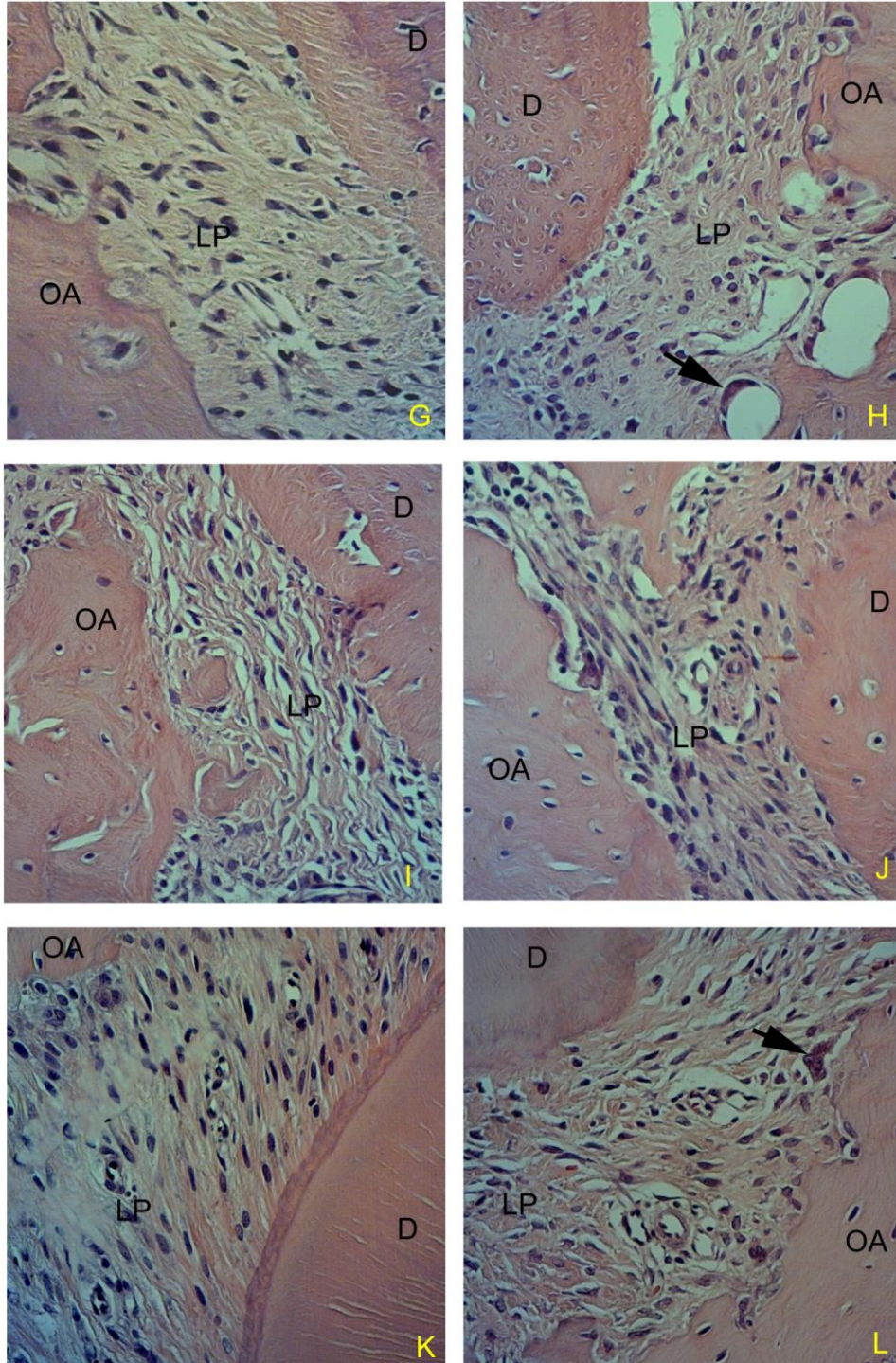


Figura 6 – Fotomicrografias (H.E. - 200x) do grupo experimental. 5^o dia (G e H), 7^o dia (I e J), 14^o dia (K e L). Dentina (D), Osso alveolar (OA), Ligamento periodontal (LP), Vaso sanguíneo (VS), Osteoclasto (OC). Seta em H indica VS. Seta em L indica OC no interior da LH.

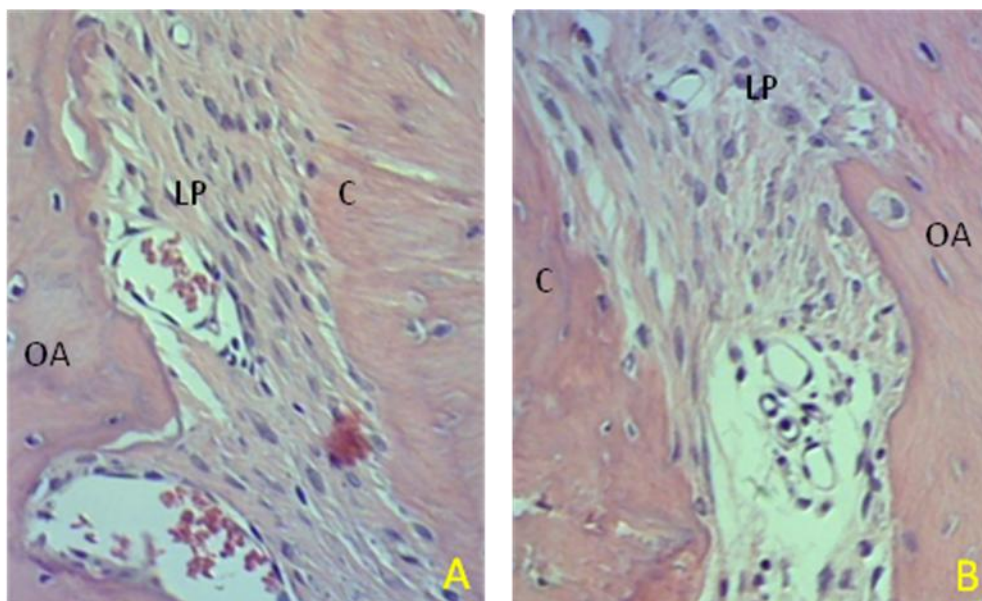


Figura 7 – Fotomicrografias (H.E. - 200x) do Grupo Saizen. Cimento (C), Osso alveolar (OA), Ligamento periodontal (LP).

ANEXO 5 – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERÍODICO *JOURNAL OF THE AMERICAN DENTAL ASSOCIATION*

Manuscript Submission

New manuscripts. All new manuscripts must be submitted via JADA's online submission and review Web site, JADA Manuscript Central (Authors who do not yet have an account on the Web site should click the "Create Account" link on the upper right-hand corner of the JADA Manuscript Central welcome page and follow the step-by-step process to open an account.). On the dashboard page, authors should select the Corresponding Author Center. In the Corresponding Author Center, they should click the "Click here to submit a new manuscript" link.

Author identification. The author should include a letter providing each author's name, degrees, professional title, work affiliations, complete address, telephone and fax numbers, and e-mail address. That cover letter can be typed in on the JADA Manuscript Central site in the field provided, or it can be uploaded to the site as a word-processed document.

Originality and exclusivity. The JADA Editor will consider only articles that are original, have not been published elsewhere and have been submitted exclusively to JADA.

Registration of clinical trials. JADA recommends, but does not require, that clinical trials be registered with a national database such as www.clinicaltrials.gov. When a clinical trial has been registered prior to publication in JADA, it will be noted in The Journal.

Submission of revised articles. After the manuscript has gone through review, the JADA Editor makes a decision as to its disposition: accept; minor revision; major revision; reject. In all but the first and last cases, the author will be invited to submit a revised manuscript via JADA Manuscript Central.

Manuscript Designation

When published, manuscripts will be placed in one of the JADA departments listed below. Authors should indicate the department for which they are submitting a manuscript, with the understanding that the editor might deem the manuscript better suited to a different department.

Unless otherwise noted, manuscripts must be no longer than 10 double-spaced pages (roughly 3,000 words), exclusive of title page, abstract, acknowledgments, references and illustrations (tables, figures, text boxes).

Peer-Reviewed-Articles

Clinical Practice. Articles with a clinical and practical focus. Potential topic areas include esthetic and restorative care, oral-systemic health, pharmacology, specialty dental practice, and informatics and technology.

- Brief Reports. Short articles focusing on specific topics that do not lend themselves to longer, more in-depth treatments (6 double-spaced pages). The articles formerly included in the “Clinical Directions” department are included in the Brief Reports category. Pilot studies also would be appropriate for this section.
- Case Reports. Short articles describing the presentation, diagnosis and management of clinical cases (6 double-spaced pages).

- Critical Review. Review articles using a systematic approach to describe what is known from the literature about a clinical dental topic and evaluating the strength of the evidence (10 double-spaced pages).
- Full Article. Full-length articles with a clinical and practical focus.
- Practical Science. Articles providing scientific information on critical issues of practical interest to general dentists, helping to bridge the gap between dental research and patient care (10 double-spaced pages).

Practice Management. Practical information about the day-to-day aspects of running a dental practice, as well as about broader management concepts and techniques. Articles on informatics and technology could appear here if the technology being discussed has a management rather than a clinical focus (10 double-spaced pages).

Research. Articles describing the results of clinical, laboratory and population-based research pertinent to dentistry and providing foundation knowledge for future application.

- Full Article. Full-length articles describing potential clinical applications of research findings (10 double-spaced pages).
- Brief Reports. Short articles focusing on specific topics that do not lend themselves to longer, more in-depth treatments (6 double-spaced pages).
- Advances in Dental Products. Articles describing research on new products useful to the clinician. Research sponsored or substantially funded by manufacturers appears here (10 double-spaced pages).

Trends

- Full Article. Articles describing trends in dentistry and health care, such as access to care; patient and practitioner demographics; economic, ethical and societal issues; state and federal law, policy and regulations that affect dentistry; and surveys of dentists on topics of interest (10 double-spaced pages).
- Brief Reports. Short articles focusing tightly on specific topics that do not lend themselves to longer, more in-depth treatments (6 double-spaced pages).

Non-Peer-Reviewed-Material

Letters to the Editor. Brief comments on issues raised and articles published in JADA. A letter about a particular article will be forwarded to the article's author for comment, if the letter is selected for publication. The JADA Editor reserves the right to edit the letters into a publishable format (550 words, maximum of five references, no illustrations). A letter concerning a recent JADA article will have the best chance of acceptance if it is received within two months of the article's publication. By sending a letter to the editor, the author acknowledges and agrees that the letter and all rights of the author in the letter become the property of The Journal. Letters may be submitted via e-mail to jadaletters@ada.org; by fax to 1-312-440-3538; or by mail to 211 E. Chicago Ave., Chicago, Ill. 60611-2678.

Manuscript Format: *Technical specifications.* Manuscripts submitted to JADA must be prepared in Microsoft Word. No manuscripts prepared in WordPerfect or other word processing software can be reviewed. Manuscripts prepared in Word

2007 must be saved down to Word 2003 format. Also, no illustrations or other material prepared in PowerPoint will be accepted for review. If your material was prepared in PowerPoint, please copy it into a Microsoft Word document or submit it as a PDF, a JPEG, a TIFF or an EPS file.

Length. Unless otherwise noted above, manuscripts must be no longer than 10 double-spaced pages (roughly 3,000 words), exclusive of title page, abstract, acknowledgments, references and illustrations.

Page setup. Pages should have 1-inch margins and must be numbered consecutively throughout the document.

Title page. Each manuscript should have a title page bearing the complete title of the manuscript and complete information on all authors. It should be the first page of the manuscript.

- Each author's degrees must be listed on the title page. JADA generally does not publish U.S. fellowships and honorary degrees and designations. Degrees below the master's level generally are not listed, unless they are the highest degree attained.
- The title page should designate the corresponding author and list that author's complete mailing address for the purposes of directing reprint requests after publication.

Abstract. A separate section describes how to format structured abstracts.

Authors. The people listed as authors should be those who made an intellectual contribution to the manuscript. All authors should be listed with their affiliations, their academic degrees and their scientific or clinical contributions to the paper. The editor and publisher reserve the right to ask for justification for each author's inclusion.

Acknowledgments. Acknowledgments should be submitted on a separate page.

Illustrations. A maximum of four figures—charts, graphs or photographs—and four tables may be submitted. (See next paragraph for an exception to this rule.) Each separate chart, graph or photograph will be counted as a separate illustration; illustrations should not be grouped together as a single illustration. Tables and figures should augment, not repeat, the text. Figures and tables should be numbered consecutively according to the order in which they are cited in the text. Regarding clinical figures, JADA will accept only digital files of at least 4 inches (roughly 100 millimeters) in width and at least 300 or more dots per inch and in JPEG, TIFF or EPS format. These may be uploaded on JADA Manuscript Central. JADA cannot accept original histologic slides and radiographs. However, The Journal will accept digital files of radiographs, magnetic resonance images and magnetic resonance angiograms. The publisher reserves the right to reject any figure that does not meet the necessary quality standards for publication.

- (Exception. For only articles on esthetic care, authors are invited to provide sufficient numbers of high-quality photographs to present their material comprehensively, provided that there is an appropriate ratio of text to photographs: the length of the manuscript must be sufficient to support

placement of photographs within the text. As a rule of thumb, assume an outside limit of three photographs per manuscript page.)

Any patient who is clearly identified in the article (either in text or in photographs) must sign a form indicating his or her consent to be thus depicted in the article. [This consent form](#) (PDF) must be submitted with the manuscript.

Manuscript Style

Basic style/writing requirements. The foundation of JADA style is the most recent edition of the American Medical Association Manual of Style. The purpose of any piece of writing is to deliver information. This requires the author to define his or her message and to present it in a way that is readily understood by and engaging to the reader. Manuscripts should be written in active voice and declarative sentences for a clear, concise style. The overall tone of these reports should be factual and professional, and thus suitable for a scholarly journal. Authors are allowed to express a personal opinion as long as the basis for that opinion is stated plainly. For example, an author may express an opinion “based on long experience and intensive observation.” Other statements of opinion and all statements of fact require references from the appropriate published literature (dental, medical, epidemiologic, practice management, etc.). Authors are invited to write headlines for their articles. Headlines should be as brief as possible while clearly conveying the main point or purpose of the article. Short subheads also should be used throughout the article to highlight key points. All submissions,

including headlines and subheads, are subject to change during the editing process.

References. All published references should be cited in the text and numbered consecutively. No references should be cited in the abstract. Each reference should be cited only once; on subsequent citations, the original number should be used. Personal communications and unpublished data should not be numbered, but should be cited in the text as follows:

(G Edmunds, DDS, oral communication, November 2004)

Authors citing sources from the World Wide Web should make use of WebCite. WebCite is an entirely free service for authors who want to refer to Web material, regardless of the publication for which they are writing. It is an archiving system for Web references (cited Web pages and Web sites) that can be used by authors, editors and publishers of scholarly papers and books to ensure that cited Web material will remain available to readers in the future. If Web references cited in JADA articles are not archived, future readers may encounter a "File Not Found" error when clicking on a cited URL. A Web citation archived on www.webcitation.org will not disappear in the future.

Citations in the reference list should follow this basic style:

- Periodical
 1. Lauterbach M, Martins IP, Castro-Caldas A, et al. Neurological outcomes in children with and without amalgam-related mercury exposure: seven

years of longitudinal observations in a randomized trial. JADA 2008;139(2):138-145.

- Book

2. Cohen S, Burns RC. Pathways of the pulp. 8th ed. St. Louis: Mosby; 2002:196.

- Book chapter

3. Byrne BE, Tibbetts LS. Conscious sedation and agents for the control of anxiety. In: Ciancio SG, ed. ADA Guide to Dental Therapeutics. 3rd ed. Chicago: American Dental Association; 2003:17-53.

- Government publication

4. Medicine for the public: Women's health research. Bethesda, Md.: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health; 2001. DHHS publication 02-4971.

- World Wide Web site

5. Hoffman ED, Klees BS, Curtis CA. Brief summaries of Medicare & Medicaid: Title XVIII and Title XIX of the Social Security Act as of November 1, 2007. Baltimore, Md.: U.S. Department of Health and Human Services, Center for Medicare & Medicaid Services, Office of the Actuary; 2007. "http://www.cms.hhs.gov/

MedicareProgramRatesStats/downloads/MedicareMedicaidSummaries2007.pdf". Accessed Aug. 28, 2008.

- Publication in press

6. McCoy J. Alteration in periodontal status as an indicator of general health. JADA (in press). NOTE: Authors should double-check the status of

any in-press work cited in their reference lists before submitting the final manuscript to JADA.

- Presentation

7. Eichenstadt L, Brenner T. Caries levels among low-income children: report of a three-year study. Paper presented at: 146th Annual Session of the American Dental Association; Oct. 7, 2005; Philadelphia.

Review

Peer review. Articles in JADA are subject to a single-blinded peer review process: reviewers know the identity of a manuscript's author(s), but authors do not know the identity of the reviewers. (Authors do have an opportunity to suggest reviewers on JADA Manuscript Central; they also have an opportunity to request the exclusion of particular reviewers from critiquing their manuscript.) Reviewers keep their critiques strictly confidential. Because the reviewers volunteer their time, reviews may take from three to four weeks to complete.

Decision. Once the reviewers have completed their critiques, the editor examines their comments and makes a decision about the manuscript's disposition: accept, minor revisions, major revisions, or reject.

Editing. JADA reserves the right to edit manuscripts to ensure conciseness, clarity and stylistic consistency and to fit articles to available space. After accepted articles are edited, they are returned to the authors for review and comment before publication. Authors will have the opportunity to review a PDF proof of their articles after they are typeset.

Authors' Responsibilities

Ethical approval of studies and informed consent/assent. For all manuscripts reporting data from studies involving human participants, human specimens or animals, JADA requires that the study have received formal review and approval, or formal review and waiver, by an appropriate institutional review board or ethics committee. This review and approval or waiver should be described in the manuscript's Methods section. Authors may be asked to request that the institutional review board provide directly to the editor documentation of the formal review and recommendation from the body responsible for ethical oversight of the study. For investigations involving humans or human specimens, authors should state in the Methods section that they obtained informed consent/assent from the study participants.

Personal communications and unpublished data. JADA requires that authors request and receive permission from each person identified in the manuscript as a source of information in a personal communication or as a source for unpublished data. By submitting their manuscripts, authors represent and warrant to JADA that such permission has been obtained, if applicable. JADA strongly recommends that such permissions be in writing and that authors should maintain the signed statements in their records for a reasonable period of time after publication of their work in JADA. Authors must specify in the manuscript the date of the communication or the data, as well as whether the communication was written or oral.

Copyright transfer. The American Dental Association owns the copyright for all editorial content published in The Journal. A statement requiring copyright transfer from authors, signed by each author, must be submitted with the manuscript. The copyright transfer form (PDF) may be reproduced. Manuscripts submitted without the requisite Copyright Transfers will not be reviewed unless and until JADA's Editor receives a valid, executed JADA Copyright Transfer Agreement from each author. (The Copyright Transfer form may be scanned and uploaded on Manuscript Central or may be faxed to the JADA editorial office at 1-716-829-6053.) If the manuscript is rejected by the ADA, all copyrights in the manuscript will be retained by the author(s). All accepted manuscripts and their accompanying illustrations become the permanent property of the American Dental Association and may not be published elsewhere in full or in part, in print or electronically, without written permission from the ADA's Publishing Division.

Reprint permission. If the manuscript contains any material, either text or illustrations, that is either exactly reproduced or adapted from a published source, the author is responsible for obtaining written permission from the publisher of that source work—or the person or agency holding the copyright, if not the publisher—to reproduce the material in JADA. JADA will not reproduce such material without written permission. The official JADA template letter (DOC) for this purpose is available online in Microsoft Word format. The author must submit a copy of the permission letter and provide JADA with complete citation information for the reproduced material.

Consent forms. Any person who is clearly identified in the article (either in text or in photographs) must sign a form indicating his or her consent to be thus depicted in the article. This consent form (PDF) must be submitted with the manuscript.

Disclosure

Each author must disclose any financial, economic or professional interests that may influence positions presented in the article. This disclosure will be published with the article. The conflict of interest form (PDF) on which disclosure must be made is available online in PDF format and may be reproduced. The form must be signed by each author and submitted with the manuscript (either scanned and uploaded on Manuscript Central or faxed to the JADA editorial office at 1-716-829-6053). Manuscripts submitted without the form will not be reviewed until JADA receives the signed form.

Open Access Policy

The full text of all journal content will be open to the public at no cost on <http://jada.ada.org> one year after publication and will link to PubMed Central, the digital library of the National Institutes of Health, and to Google Scholar. This includes all content posted on <http://jada.ada.org> from January 1995 through one year prior to the present. All JADA Copyright Transfer Forms will require that the author relinquish posting and distribution rights of their manuscripts to the ADA prior to acceptance; otherwise, the manuscript will not be published.

National Institutes of Health Public Access Policy: Authors' Responsibilities

The National Institutes of Health (NIH) Public Access Policy implements a law passed in December 2007 that affects authors who receive funding from the NIH. Effective April 7, 2008, the law mandates that all peer-reviewed articles that arise, in whole or in part, from direct costs funded by NIH, or from NIH staff, that are accepted for publication by a peer-reviewed journal—including JADA—must be deposited with the National Library of Medicine’s PubMed Central, in the form of a copy of the manuscript’s final version on its acceptance. NIH provides a Web site at <http://publicaccess.nih.gov> that contains answers to questions authors may have about this policy.

On or after April 7, 2008, when the author deposits the accepted manuscript with PubMed Central, he or she should specify that the manuscript is not to be made available until 12 months after publication (not acceptance). Thereby, the manuscripts will be made publicly available by PubMed Central at the same time that JADA makes its full text available to the public free of charge.

JADA holds the copyright to all material it publishes except for material authored solely by U.S. government employees. Please see the [JADA Copyright Transfer form](#) (PDF) for further details.

Checklist

If any of the following statements applies to you, or any co-author of your article, you are required to deposit your manuscript, if accepted, with PubMed Central.

- directly funded by an NIH grant or cooperative agreement active in Fiscal Year 2008 (October 1, 2007-September 30, 2008) or beyond

- directly funded by a contract signed on or after April 7, 2008
- directly funded by the NIH Intramural Program
- paid a salary by NIH

Author's Preprints and Complimentary Copies

On publication, each article's primary author will receive 25 complimentary copies of the article. In addition, he or she will receive two copies of the JADA issue containing the article. Before publication, the author will have an opportunity to order additional preprints at a special prepublication discount. Otherwise, authors may purchase reprints post-publication at the higher prevailing rate.

Reprinting of Material Published in JADA

All accepted manuscripts and their accompanying illustrations become the permanent property of the American Dental Association, owner and publisher of JADA, and may not be published elsewhere in full or in part, in print or electronically, without written permission from the American Dental Association. Any party seeking individual or multiple copies of material published in JADA must request permission in writing from the Permissions Editor, Publishing Division, American Dental Association, 211 E. Chicago Ave., Chicago, Ill. 60611. The request must state exactly what material is being borrowed, the issue in which it was published, the intended use of the material being borrowed, the name of the publication in which the reprinted material will appear (if applicable), the print quantity of distribution, the audience and whether the use is for financial gain.

Further guidelines on reprinting are available from the publisher.

Publicity

Any publicity (press releases, press coverage, etc.) about articles published in JADA must be coordinated through the ADA Public Affairs Department (phone 1-312-440-2806, e-mail mediarelations@ada.org).

Submission Checklist

Before submitting a manuscript, the author should make sure he or she has completed all the necessary steps.

- Electronic files of the manuscript and each table and figure should be uploaded.
- A copyright transfer statement and a conflict of interest form, signed by each author, should be either scanned and uploaded to JADA Manuscript Central or faxed to the JADA editorial office at 1-716-829-6053. Please do not submit your forms until you submit your manuscript.
- The cover letter should indicate the JADA department to which the manuscript is being submitted.
- The manuscript should include a structured abstract in the proper format (according to the JADA department to which it is being submitted).
- All references should be checked for accuracy, correct format and completeness.
- If applicable, acknowledgments should be included in the manuscript on a separate page.

- Complete information—name, degrees, position or title, address, phone and fax numbers, e-mail address—should be included for the corresponding author.

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERÍODICO *JOURNAL OF THE AMERICAN DENTAL ASSOCIATION*, PARA ELABORAÇÃO DO ABSTRACT

Features in selected departments in JADA include structured abstracts. Below are descriptions of the structured abstract formats for the selected JADA departments—Clinical Practice, Practice Management, Research and Trends. The headings indicated here should be included in the abstract. Authors should indicate the department for which they are submitting a manuscript and develop the abstract accordingly, with the understanding that the editors could designate the manuscript for a different department and require a revision in the abstract.

No abstract may exceed 200 words. If an abstract goes over that word count, JADA Manuscript Central will flag it and direct the author to shorten the abstract. The word counts given in parentheses after each subhead are not requirements, merely suggestions to help keep authors within the 200-word limit. As long as an abstract in total does not exceed 200 words regardless of the length of the individual sections, it will be acceptable.

- Clinical Practice: Full Articles
- Clinical Practice: Brief Reports
- Clinical Practice: Critical Review; Practice Science
- Clinical Practice: Case Reports
- Practice Management
- Research: Full Articles; Advances in Dental Products
- Research: Brief Reports
- Trends: Full Articles
- Trends: Brief Reports

Clinical Practice: Full Articles

Background (30 words). A summary of the general topic and the purpose or hypotheses of the study.

Methods (50 words). A description of the materials (generic names of drugs and equipment should be used, unless the particular brands are crucial to the study); the methods (including the type of study design); the subjects (important eligibility criteria, number and selection process).

Results (50 words). A statement of the primary results of the study; the types of analyses used should be indicated, as should levels of statistical significance and confidence intervals.

Conclusions (30 words). A statement of the conclusions (the answers to the hypotheses posed at the beginning of the study). Only the conclusions that are directly supported by the evidence provided by the study should be included. Any need for further study should be indicated.

Clinical Implications (30 words). An indication of what the conclusions imply for clinical practice.

Key Words (3-10 words). A list of key words highlighting the article's most important topics.

Note: JADA Manuscript Central offers an extensive list of key words from which authors may choose.