

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

JUCIENNE SALGADO RIBEIRO

EFEITO DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO NO MOVIMENTO DENTÁRIO
INDUZIDO

CURITIBA

2008

JUCIENNE SALGADO RIBEIRO

**EFEITO DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO NO MOVIMENTO DENTÁRIO
INDUZIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito à obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Ortodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Souza Camargo

Co-Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Trindade Grégio

CURITIBA

2008

R484e
2008

Ribeiro, Jucienne Salgado

Efeito do hormônio de crescimento no movimento dentário induzido = Effect of growth hormone in experimental tooth movement / Jucienne Salgado Ribeiro ; orientadora, Elisa Souza Camargo ; co-orientadora, Ana Maria Trindade Grégio. – 2008.
59 f., il. ; 30 cm

Texto em português e inglês
Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2008
Inclui bibliografias

1. Ortodontia. 2. Hiperpituitarismo. 3. Movimentação dentária. 4. Ossos - Crescimento. I. Camargo, Elisa Camargo. II. Grégio, Ana Maria Trindade. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título. V. Título: Effect of growth hormone in experimental tooth movement .

CDD 20. ed. – 617.643

DEDICATÓRIA

À memória do meu pai Adelson, pela inspiração e exemplo de vida. A saudade que permanece realimenta o amor que jamais será apagado de meu coração.

À minha querida mãe, Jussara, pelo amor incondicional, presença constante e dedicação. Você é um exemplo de determinação e força, sempre conquista soluções para a vida das pessoas que ama. Muitas vezes renunciou dos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus.

Ao meu padrasto, Tapajós, pelo apoio, incentivo e confiança. Sua força, determinação e coragem me mostraram que devemos trabalhar e resistir pela vida. Obrigada por confiar e acreditar no meu talento, e por sempre oferecer um abraço e uma boa conversa.

À minha irmã, Julliane, pela alegria, amor, doação. Pelos momentos felizes, com carinho e estímulo necessários à conquista desse ideal e de todos os de minha vida.

Ao meu marido, Augusto, parceiro de todos os momentos, paciente e perseverante com meus momentos de abnegação, que me encorajou em momentos de dificuldades e dividiu comigo muitas alegrias. Seu incentivo, apoio e companhia foram fundamentais para a realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À querida Profa. Dra. Elisa Souza Camargo, que muito mais do que uma orientadora, foi para mim uma amiga, um exemplo de pessoa e de mestra. Obrigada pela orientação exemplar, dedicação, apoio, pela paciência com meus erros e pelo entusiasmo com os meus acertos. Ser mestre é ser exemplo de dedicação, doação, dignidade e, sobretudo, de amor. Expresso aqui meu profundo reconhecimento e eterna gratidão, carinho e admiração.

AGRADECIMENTOS

À Deus sempre presente em minha vida, por ter me dado perseverança e sustentação diante das dificuldades enfrentadas ao longo desses dois anos. Agradeço por tudo aquilo que já realizei e confio em Vós naquilo que ainda hei de realizar.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), pela oportunidade de realizar este Curso de Mestrado, colaborando com meu desenvolvimento profissional.

À Capes, por me conceder bolsa de estudo, possibilitando a realização deste Curso de Mestrado.

Ao coordenador dos cursos de Pós-Graduação em Odontologia na PUCPR, Prof. Dr. Sérgio Vieira, meu agradecimento pela atenção sempre dispensada, confiança e amizade.

Às co-orientadoras, Profa. Dra. Ana Maria Trindade Grégio e Profa. Dra. Maria Ângela Naval Machado, pela interpretação dos resultados e atenção em que acrescentaram contribuições indispensáveis para a realização deste trabalho.

Ao doutorando José Vinicius Bolognese Maciel, por tanta disponibilidade, atenção, apoio e dedicação no desenvolvimento deste trabalho, compartilhando conhecimento, proporcionando excelentes idéias e aliviando minhas dúvidas.

Pelo saber transmitido nesses dois anos, aos professores do programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração Ortodontia da PUCPR, Hiroshi Maruo, Odilon Guariza Filho e Orlando Tanaka que contribuíram muito em minha formação profissional e são referências de experiência, dedicação e competência.

Aos membros da banca de qualificação Prof. Dr. Odilon Guariza Filho e Prof. Dr. Antônio Adilson Soares de Lima pela valiosa contribuição.

Ao funcionário Daniel Fiedler, nosso anjo-da-guarda, pela contribuição nas etapas da parte experimental da pesquisa e pelo constante incentivo, disponibilidade e amizade.

Ao Biotério da PUCPR, de modo especial ao zootecnista Rafael Zotz e ao médico-veterinário Cândido José Thomaz Pereira, que com extrema gentileza e disponibilidade ofereceram suporte para a obtenção e manutenção dos animais utilizados neste trabalho.

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.

Aos colegas Bruno Bochnia Cerci, Fernanda Brasil Baboni, Luciana Borges Retamoso, Lúegya Amorin Henriques Knop, Luis Filipe Siu Lon, Marcos Adriano Sabatoski, Mariana Bridi Moschetti, Raul Sampaio Mei, Saulo Régis de Oliveira Junior, Tais de Moraes Alves da Cunha, com os quais foram vividas tantas horas e experiências comuns, agradeço pela amizade e pelos conhecimentos que dividimos.

Ao Prof. Dr. Sérgio Aparecido Ignácio, pela orientação estatística.

Aos professores de áreas conexas, pelo convívio e contribuições para a minha formação neste Curso de Mestrado.

À secretária Neide Reis Borges, às estagiárias Paula Maiza de Mache e Aline Cristine Machado Wiens, à funcionária Silvana Casagrande Gabardo e aos demais funcionários da Clínica de Odontologia da PUCPR, pelo apoio e acolhimento, contribuindo para a realização deste trabalho, direta ou indiretamente.

Aos amigos e familiares, que pacientemente dividiram os momentos pelos quais vivi, neste período de Curso de Mestrado, agradeço pelo incentivo e apoio.

Aos pacientes da clínica de Ortodontia pela confiança depositada em nosso atendimento.

Aos alunos do 7º e 8º períodos do curso de Odontologia da PUCPR, pela oportunidade da vivência na ação docente.

À todos que de alguma maneira, auxiliaram na realização deste trabalho e na minha formação profissional.

LISTA DE ABREVIATURAS

C – Grupo Controle

E – Grupo Experimental

FB - Fibroblastos

FC – Fibras Colágenas

HC – Hormônio de Crescimento

LH – Lacunas de Howship

LP – Ligamento Periodontal

OC - Osteoclastos

PUCPR – Pontifícia Universidade Católica do Paraná

UI – Unidades Internacionais

VS – Vasos Sangüíneos

SUMÁRIO

1 ARTIGO EM PORTUGUÊS	02
PÁGINA TÍTULO	03
RESUMO	04
INTRODUÇÃO	06
MÉTODO	07
RESULTADOS	09
DISCUSSÃO	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
TABELAS	17
FIGURAS	18
2 ARTIGO EM INGLÊS	20
TITLE PAGE	21
ABSTRACT	22
INTRODUCTION	23
METHOD	25
RESULTS	27
DISCUSSION	28
REFERENCES	32
TABLES	35
FIGURES	36
3 ANEXOS	38
ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	39
ANEXO 2 – MÉTODO	40
ANEXO 3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
ANEXO 4 – ILUSTRAÇÕES	49
ANEXO 5 – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO <i>JOURNAL OF DENTAL RESEARCH</i>	50

1 ARTIGO EM PORTUGUÊS

PÁGINA TÍTULO

Efeito Do Hormônio De Crescimento No Movimento Dentário Induzido

JS Ribeiro, AMT Grégio¹, ES Camargo²

Departamento de Ortodontia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

¹ Departamento de Farmacologia

² Autor para correspondência, rua Imaculada Conceição, 1155 / 80.215-901 – Curitiba-PR – Brasil / Fone: 55 41 3271-1637 / Fax: 55 41 3271-1405 / e-mail: elisa.camargo@pucpr.br

Palavras-chave: hormônio de crescimento, movimento dentário, tecido ósseo, colágeno

Número de palavras no resumo: 203

Número de palavras no resumo e texto: 2.632

Número de tabelas e figuras: 04

Número de referências bibliográficas: 30

RESUMO

Efeito do hormônio de crescimento no movimento dentário induzido

A remodelação óssea decorrente do movimento ortodôntico é regulada por fatores locais e sistêmicos. Um importante regulador do metabolismo ósseo é o hormônio de crescimento. O objetivo foi avaliar histologicamente o efeito do hormônio de crescimento durante movimento dentário induzido em ratos. A amostra foi composta de 80 ratos *Wistar* machos divididos em dois grupos: controle (C) e experimental (E), com os períodos de observação nos 3º, 7º, 14º e 21º dias. Força ortodôntica (30cN) foi aplicada por meio de dispositivo instalado no primeiro molar superior direito. No grupo E foi administrado 0,1 UI/kg/dia de HC e no grupo C 0,5ml/kg/dia de solução salina, ambos iniciando no dia anterior da instalação do dispositivo até o momento da eutanásia. As peças foram processadas e avaliadas em microscopia de luz e luz polarizada. Após análise estatística, verificou-se que o grupo E apresentou maior quantidade de osteoclastos nos 3º e 7º dias e lacunas de Howship no 3º dia ($p<0,05$) e menor quantidade de vasos sanguíneos e maior quantidade de colágeno maduro nos 3º e 7º dias que o grupo C ($p<0,05$). Portanto, conclui-se que o HC acelerou e intensificou a reabsorção óssea e promoveu retardo na formação do colágeno imaturo durante o movimento dentário induzido.

INTRODUÇÃO

O hormônio de crescimento (HC) é um importante e potente hormônio metabólico secretado por células da hipófise anterior, influenciada por diversas condições normais e fisiopatológicas (Ehrnbor and Rósen, 2008). Sua estrutura é composta de uma cadeia de polipeptídeos simples de 191 aminoácidos com duas pontes bissulfeto e peso molecular de 22 kDa (Niall, 1971; Ehrnbor and Rósen, 2008) e meia-vida plasmática de 15 a 20 minutos após sua secreção ou injeção intravenosa. Após a administração subcutânea ou intramuscular, concentrações sanguíneas do HC alcançam seu pico entre 1 a 3 horas e queda para níveis indetectáveis após 24 horas (Parker *et al.*, 1962).

O HC é uma das mais importantes substâncias reguladoras da remodelação e crescimento ósseo (Tresguerres *et al.*, 2005). Crianças com diferentes formas de deficiência deste hormônio ou defeitos na via de transdução do HC tipicamente não utilizam todo o potencial de crescimento (Albertsson-Wikland and Rosberg, 1988). Há alguns anos, a reposição do HC possuía seu uso limitado ao tratamento destes pacientes, mas com o desenvolvimento de um HC sintético produzido por bactérias utilizando a técnica do DNA recombinante, houve maior indicação do tratamento com reposição sistêmica do HC (Lanes, 2000).

Atualmente, indivíduos com endocrinopatias específicas, debilitação associada à AIDS, Síndrome de Turner, insuficiência renal crônica (Carrol *et al.*, 1998; Simpson *et al.*, 2002), doença pulmonar obstrutiva crônica (Pape *et al.*, 1991) e septicemia (Koea *et al.*, 1996) realizam reposição com HC.

Este hormônio também é utilizado, de forma ilícita e sem supervisão médica, para melhorar a performance de atletas e de pessoas que realizam atividades físicas em academia (Niall, 1971; Ehrnbor and Rósen, 2008). Um estudo relata que 5% dos estudantes do sexo

masculino do ensino médio em escolas americanas utilizam o HC como agente anabólico (Rickert *et al.*, 1992).

Além disso, o HC pode reverter algumas mudanças relacionadas com o envelhecimento que está associado com redução nos níveis sanguíneos deste hormônio, e sua administração pode ocasionar aumento da densidade e do colágeno da pele e/ou aumento da massa corpórea magra, massa muscular e massa óssea (Rudman *et al.*, 1990; Gibney *et al.*, 1999).

Considerando sua ampla indicação e uso, bem como a consolidação dos seus efeitos anabólicos e lipolíticos e atuação direta na formação e reabsorção óssea (Stracke *et al.*, 1984; Morel *et al.*, 1993; Ong *et al.*, 2001), pode-se indagar se o HC teria competência de interferir na remodelação óssea durante o movimento dentário ortodôntico.

O HC 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). No entanto, não há na literatura pesquisas que demonstrem se há alguma modificação na remodelação óssea induzida pelo tratamento ortodôntico em indivíduos que realizam a suplementação com HC.

O movimento dentário induzido produz reações teciduais que estão associadas não somente a fatores locais pertinentes aos dentes e à oclusão, como também a fatores sistêmicos relacionados ao metabolismo ósseo (Verna and Melsen, 2003). Diante disso, o objetivo foi verificar o efeito do HC pela quantificação de osteoclastos, lacunas de Howship e vasos sanguíneos no ligamento periodontal e pela análise da maturação do colágeno durante o movimento dentário induzido em ratos *Wistar*.

MÉTODO

O presente estudo foi aprovado com parecer nº 69.07 pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR).

Foram utilizados 80 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) com 12 semanas de vida, pesando aproximadamente 300 – 350g, fornecidos e mantidos pelo Biotério da PUCPR. Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas, 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 2 grupos: controle (C) e experimental (E). No grupo C foi administrada solução salina 0,9% - 0,5ml/kg diariamente (placebo) para simular o estresse sofrido pelos animais até o momento da eutanásia, após 3, 7, 14 e 21 dias. No grupo E foi administrado o hormônio de crescimento SAIZEN® 1,33 mg (4UI) - Serono Prods. Farms. Ltda. – Somatropina (r-hHC) - (Lote Y06A1957, Fabricação: 02/07, Validade: 01/09, Registro 1.1124.0184, Laboratoires Serono, Aubonne, Suisse). Foram realizadas aplicações diárias de 0,1UI de HC/kg/dia, via subcutânea na região abdominal alternando entre o lado direito e esquerdo, iniciando um dia antes da instalação do dispositivo ortodôntico e prosseguindo com o uso contínuo até o momento da eutanásia, sempre no mesmo horário (Bouillon and Prodonova, 2000).

Para a instalação do dispositivo 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 0,25 ml/animais. Esta substância foi injetada no músculo quadríceps do membro inferior esquerdo.

O dispositivo ortodôntico foi construído a partir do modelo proposto por Heller e Nanda (1979) que consistiu em uma mola de níquel-titânio fechada de 9mm Sentalloy

(G&H[®] Wire Company REF CCOF9XL Lote 103946 Hanover, Germany) e fio de amarelo de aço inoxidável com 0,022 polegada, para fixação da mola no primeiro molar direito e incisivos superiores. Força de 30cN foi mensurada por dinamômetro de precisão da marca Dentauro, modelo *Stress and tension gauge* (25-250cN). Após a ativação inicial, o dispositivo não foi reativado durante o período experimental, no entanto seu posicionamento foi conferido diariamente.

Os animais foram eutanasiados por dose excessiva de solução anestésica, 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 escalonados com espessura de 4µm desde a crista óssea alveolar até o ápice radicular. Os cortes obtidos foram corados pelo método hematoxilina-eosina de Harris e Lison ou picrossirius.

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 adjacente à raiz méso-vestibular do primeiro molar superior direito. As lâminas foram analisadas sob microscopia de Luz, com aumento original de 200X. 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).

As lâminas coradas por picrossirius foram analisadas sob microscopia de luz polarizada, com aumento original de 100X, para determinar as mudanças estruturais no colágeno presente na neoformação da matriz trabecular, adjacente ao lado de tração da raiz méso-vestibular do primeiro molar superior direito. Este método permite uma avaliação indireta do estágio de organização da matriz óssea baseada na birrefringência dos feixes de

fibras do colágeno. As fibras de colágeno maduro, apresentam-se vermelho-alaranjadas, enquanto as do tipo imaturo são verde-amareladas. A análise foi realizada por meio de um sistema de análise de imagens automático do *software* Image Pro-Plus versão 4,5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), que calculou a porcentagem de colágeno maduro e imaturo. A mensuração foi realizada em um campo selecionado aleatoriamente de cada secção, sendo realizada uma média da porcentagem para cada animal.

Ambas análises foram realizadas por um único operador devidamente calibrado que desconhecia o grupo a que cada lâmina pertencia.

Visando comparar os grupos entre si, foi aplicado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, teste de homogeneidade de variância de Levene para todas as variáveis e o teste de Kruskal Wallis.

RESULTADOS

No 3º dia do grupo controle (C), na área de compressão, verificou-se ligamento periodontal (LP) com feixes de fibras colágenas (FC) desorganizados, predomínio de fibroblastos (FB) ovóides e intensa vascularização (Fig.1A e Tab.1). Foi observado aumento na quantidade de osteoclastos (OC) localizados no interior das lacunas de Howship (LH) e contíguos à superfície óssea. Na área de tração o LP encontrava-se com feixes de FC estirados, oblíquos e paralelos entre si com predomínio de FB fusiformes e moderada vascularização (Fig.1C e Tab.1). Ao microscópio de luz polarizada, houve preponderância de FC com birrefringência esverdeada irregular, indicando colágeno imaturo e o início da produção da matriz de colágeno (Fig.2A e Tab.2).

Após a fase inicial do movimento dentário, a espessura do LP nos dois lados encontravam-se com tendência à normalidade nos 14º e 21º dias. Na área de compressão, os feixes de FC estavam desorganizados com predomínio de FB ovóides (Fig.1E,1I,1M e

Tab.1), enquanto que na área de tração, os feixes encontravam-se estirados, oblíquos e paralelos entre si com predomínio de FB fusiformes dispersos na matriz (Fig.1G,1K,1O e Tab.1). Ocorreu gradativa diminuição no número de vasos sangüíneos (VS) do 7º até o 21º dia e um predomínio no número de OC no 7º dia, não sendo identificados com a mesma freqüência nos últimos períodos (Tab.1). Na análise sob luz polarizada pôde ser observada maior organização e aumento das FC maduras com coloração amarelo-avermelhada no 7º dia. Evidência de maiores níveis de síntese da matriz do colágeno, com expressão de FC mais organizadas e espessas, com birrefringência amarelo-avermelhada foram constatadas nas fases finais do movimento dentário (Fig.2B-2D e Tab.2).

No grupo E, do 3º ao 21º dia as áreas de compressão e tração apresentaram raros VS. Na área de compressão observou-se feixes de FC desorganizados e predomínio de FB ovóides, enquanto que na área de tração, os feixes encontravam-se estirados, oblíquos e paralelos entre si permeados por FB fusiformes. O osso alveolar exibiu unidades de reabsorção constituídas por numerosos OC, demonstrando atividade reabsortiva intensa no 3º dia (Fig.1B). Posteriormente, a superfície óssea encontrou-se irregular com presença de LH contendo OC no 7º e 14º dia (Fig.1F,1J). No 21º dia foram observados ocasionais OC e LH (Fig.1N e Tab.1). Nestes períodos de observação, sob luz polarizada, a matriz apresentava-se constituída por fibras de espessura variada, com nível organizacional mais evidente que no grupo C, mostrando maior contingente de fibras de coloração avermelhada (Fig.2E-2H e Tab.2).

DISCUSSÃO

As características morfológicas teciduais e celulares encontradas no grupo C correspondem a uma típica resposta biológica às forças mecânicas e às reações químicas

promovidas pela movimentação dentária ortodôntica sobre o LP e osso alveolar, concernentes aos estudos de Heller e Nanda (1979) e Macapanpan *et al.* (1954). A comparação deste grupo com o grupo E demonstra que a administração do HC induz a mudanças dinâmicas no LP e osso alveolar em dentes de ratos movimentados ortodonticamente.

Pode-se considerar que o nível de força de 30cN, selecionado para este estudo, produziu força ótima por ter ocasionado efetiva indução do movimento dentário sem causar nenhum efeito adverso no grupo controle, como a formação de áreas hialinas (Ong *et al.*, 2000; Ong *et al.*, 2001). O tempo de permanência do dispositivo na cavidade bucal foi baseado em estudo prévio que demonstra que 10 a 14 dias são necessários para um completo ciclo da remodelação óssea do LP em ratos (King *et al.*, 1991).

Mesmo com ampla indicação e uso, não existem estudos relatando os efeitos do HC durante o movimento dentário.

No grupo E houve predomínio de OC no 3º dia e declínio nos períodos subsequentes, com diferença estatisticamente significativa no 3º e 14º dias quando comparado com o grupo C ($p < 0,05$). Estes resultados concordam com Tresguerres *et al.* (2005) que verificaram aumento da reabsorção óssea após 1 semana de aplicação local de HC no tecido peri-implantar.

Stracke *et al.* (1984), Morel *et al.* (1993), Hansen *et al.* (1996) e Ong *et al.* (2001) relataram que o HC acentua o *turnover* da remodelação óssea, estimulando a reabsorção e a ativação dos osteoblastos, resultando em neoformação óssea.

No grupo E foi observada diminuição estatisticamente significativa na quantidade de VS quando comparado com o grupo C nos 3º e 7º dias ($p < 0,05$). Existem poucos estudos na literatura que verifiquem diretamente se o HC modula a angiogênese, porém há evidência de

que quando há deficiência ou excesso de HC, a função vascular pode ser modificada (Silha *et al.*, 2005).

O método de polarização combinado com a análise computadorizada é útil para avaliar o efeito do HC no movimento dentário ortodôntico, e permite a correlação da organização estrutural das FC (Andrade *et al.*, 1997), com a área de osteogênese do osso primário (trabecular). O método de polarização tem sido utilizado como um possível indicador de agregação de colágeno (Andrade *et al.*, 1997; Junqueira *et al.*, 1982), porém, não há na literatura estudos utilizando o método picrosirius em experimentos relacionados a movimento dentário induzido.

No grupo C a análise morfométrica no lado de tração demonstra FC imaturas nas fases iniciais com um progressivo amadurecimento das mesmas nos períodos finais. Entretanto, no grupo E somente a birrefringência em tons do amarelo ao vermelho indicando fibras colágenas de osso maduro foram observadas, e quando comparado com o grupo C, nos períodos de 3 e 7 dias, apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Contudo, estudos *in vitro* indicam que o HC pode atuar diretamente nos osteoblastos e exercer efeitos anabólicos na formação óssea (Stracke *et al.*, 1984; Morel *et al.*, 1993).

Esta divergência pode ser explicada pelo fato da reposição do HC ocasionar um efeito bifásico, havendo um predomínio inicial de reabsorção óssea e, após 12 a 24 meses de tratamento, ocorrer a estimulação da neoformação óssea com subsequente ganho de massa óssea (Simpson *et al.*, 2002; Carroll *et al.*, 1998). Considerando essas mudanças no metabolismo ósseo, observa-se que é necessário um longo tempo de observação para obter a neoformação óssea, o que não foi realizado neste estudo, pois os incisivos superiores utilizados como ancoragem possuem erupção contínua.

Estes resultados instigam a formação da hipótese que o HC pode possuir a competência para estimular a reabsorção e, possivelmente, retardar a neoformação óssea decorrente da diminuição da vascularização. Sabe-se que a 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 (Toms *et al.*, 2000).

Com isso, sugere-se que indivíduos em tratamento ortodôntico e que utilizam o HC necessitam intervalos maiores entre as aplicações das forças ortodônticas leves, uma vez que o processo de neoformação óssea é retardado, e por apresentarem reabsorção óssea mais intensa principalmente nas fases iniciais da administração da droga. Outra recomendação seria iniciar o tratamento ortodôntico após a fase inicial de administração do HC já que este estimula a formação óssea somente após 12 a 24 meses. Controle radiográfico deve ser feito freqüentemente para avaliar o padrão de reabsorção óssea.

Conclui-se, portanto, que o hormônio de crescimento acelerou e intensificou a reabsorção óssea e ocasionou um retardo da formação de colágeno imaturo após movimento dentário induzido em ratos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albertsson-Wikland K, Rosberg S (1988) Analyses of 24-hour growth hormone profiles in children: relation to growth. *J Clin Endocrinol Metab* 67(3): 493-500.
- Andrade GB, Riet-Correa F, Montes CN, Battlehner CN, Saldiva PHN (1997) Dating of fibrotic lesions by the picosirius-polarization method. an application using the lesions of lechiguana (bovine focal proliferative fibrogratulous panniculitis). *Eur J Histochem* 41(3):203-209.
- Arias OR, Marquez-Orosco MC (2006) Aspirin, acetaminophen, and ibuprofen: their effects on orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 130(3):364-370.
- Bouillon R, Prodonova A (2000) Growth and hormone deficiency and peak bone mass. *J Pediatr Endocrinol Metab* 13(Suppl 6):1327-36.
- Carroll PV, Christ ER, Bengtsson BA, Carlsson L, Christiansen D, Clemmons D, Hintz R, Ho K, Laron Z, Sizonenko P, Sonksen PH, Tanaka T, Thorner M (1998) Growth hormone deficiency in adulthood and the effects of growth hormone replacement: a review. *J Clinical Endocrinol Metab* 83(2):382-395.
- Ehrnbor C, Rosén T (2008) Physiological and pharmacological basis for the ergogenic effects of growth hormone in elite sports. *Asian J Androl* 10(3):373–383.
- Gibney J, Wallace JD, Spinks T, Schnorr L, Ranicar A, Cuneo RC, Lockhart S, Burnand KG, Salomon F, Sonksen PH, Russell-Jones D (1999) The Effects of 10 Years of Recombinant Human Growth Hormone (GH) in Adult GH-Deficient Patients. *J Clin Endocrinol Metab* 84(8):596-602.
- Guicheux J, Gauthier O, Aguado E, Pilet P, Couillaud S, Jegou D, Daculsi G, Heymann D (1998) Human growth hormone locally released in bone sites by calcium-phosphate biomaterial stimulates ceramic bone substitution without systemic effects: a rabbit study. *J Bone Miner Res* 13(4):739-748.
- Hansen TB, Brixen K, Vahl N, Jorgensen JOL, Christiansen JS, Mosekilde L, Hagen C (1996) Effects of 12 Months of Growth Hormone (GH) Treatment on Calcitropic Hormones, Calcium Homeostasis, and Bone Metabolism in Adults with Acquired GH Deficiency: A Double Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study. *J Clin Endocrinol Metab* 81(9):3352–3359.

- Heller IJ, Nanda R (1979) Effect of metabolic alteration of periodontal fibers on orthodontic tooth movement. An experimental study. *Am J Orthod* 75(3):239-258.
- Junqueira LCU, Montes GS, Sanches EM (1982) The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the picrosirius-polarization method. *Histochemistry* 74(1):153-156.
- King GJ, Keeling SD, Wronski TJ (1991) Histomorphometric study of alveolar bone turnover in orthodontic tooth movement. *Bone* 12(6):401-409.
- Koea JB, Breier BH, Douglas RG, Gluckman PD, Shaw JHF (1996) Anabolic and cardiovascular effects of recombinant human growth hormone in surgical patients with sepsis. *Brit J Surg* 83(2):196-202.
- Lanes R (2000) Growth velocity, final height and bone mineral metabolism of short children treated long term with growth hormone. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 1(1):33-46.
- Macapanpan LC, Weinmann JP, Brodie AG (1954) Early tissue changes following tooth movement in rats. *Angle Orthod* 24(02):79-95.
- Marcus R (1997) Skeletal effects of growth hormone and IGF-I in adults. *Horm Res* 48(suppl5):60-64.
- Morel G, Chavassieux P, Barenton B, Dubois PM, Meunier PJ, Boivin G (1993) Evidence for a direct effect of growth hormone on osteoblasts. *Cell Tissue Res* 273(2):279-286.
- Niall HD (1971) Revised Primary Structure for Human Growth Hormone. *Nature New Biol* 230(11):90-91.
- Ong CKL, Walsh LJ, Harbrow DJ, Taverne TA, Symons AL (2000) Osseous morphology and spatial relationships of the temporomandibular joint: comparisons of normal and anterior disc positions. *Angle Orthod* 70(1):118-125.
- Ong CKL, Joseph BK, Waters MJ, Symon AL (2001) Growth Hormone Receptor and IGF-I Receptor Immunoreactivity During Orthodontic Tooth Movement in the Prednisolone-Treated Rat. *Angle Orthod* 71(6):486-493.
- Pape GS, Friedman M, Underwood LE, Clemmons DR (1991) The effect of growth hormone on weight gain and disease pulmonary function in patients with chronic obstructive lung disease. *Chest* 99(6):1495-1500.

- Parker ML, Utiger RD, Daughaday WH (1962) Studies on human growth hormone. II. the physiological disposition and metabolic fate of human growth hormone in man. *J Clin Invest* 41(2):262–268.
- Rickert VI, Pawlak-Morello C, Sheppard V, Jay MS (1992) Human Growth Hormone: A New Substance Of Abuse Among Adolescents? *Clin Pediatr* 31(12):723–726.
- Rudman D, Feller AG, Nagraj HS, Gergans GA, Lalitha PY, Goldberg AF, Schlenker RA, Cohn L, Rudman IW, Mattson DE. (1990) Effects of human growth hormone in men over 60 years old. *N Engl J Med* 323(1):1–6.
- Silha JV, Krsek M, Hana V, Marek J, Weiss V, Jezkova J, Rosickat M, Jarkovska Z, Murphy LJ (2005) The effects of growth hormone status on circulating levels of vascular growth factors. *Clinical Endocrinology* 63(1):79–86.
- Simpson H, Savine R, Sonksen P, Bengtsson BA, Carlsson L, Christiansen JS, Clemmons D, Cohen P, Hintz R, Ho K, Mullis P, Robinson I, Strasburger C, Tanaka T, Thorner M (2002) Growth hormone replacement therapy for adults: Into the new millennium. *Growth Hormone & IGF Research* 12(1):1–33.
- Stracke H, Schulz A, Moeller D, Rossol S, Schatz H (1984) Effect of growth hormone on osteoblasts and demonstration of somatomedin-C/IGF I in bone organ culture. *Acta Endocrinol* 107(1):16-24.
- Toms A, Gannon B, Carati C (2000) The immunohistochemical response of the rat periodontal ligament endothelium to an inflammatory stimulus. *Austr Orthod J* 16(2):61-68.
- Tresguerres IF, Alobera MA, Baca R, Tresguerres JAF (2005) Histologic, morphometric, and desitometric study of peri-implant bone in rabbits with local administration of growth hormone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 20(2):193-202.
- Verna C, Melsen B (2003) Tissue reaction to orthodontic tooth movement in different bone turnover conditions. *Orthod Craniofac Res* 6(3):155-163.

TABELAS

TABELA 1 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DE TODAS AS VARIÁVEIS DE ACORDO COM O TEMPO E TESTE NÃO PARAMÉTRICO DE COMPARAÇÕES MÚLTIPAS INTERGRUPOS E NO MESMO PERÍODO DE OBSERVAÇÃO, PUCPR - 2008

Variável	Dia	Grupo Controle (n=10)			Grupo Experimental (n=10)			p
		Média	Mediana	D.P.	Média	Mediana	D.P.	
Osteoclastos	3	6,3	6,5	1,337	31,2	31,5	3,225	0,000*
	7	16,9	17	3,348	19	19	4,714	1,000
	14	3,3	3,5	1,059	14,8	14	2,348	0,036*
	21	1,4	1	1,265	5,3	6	2,359	1,000
Lacunas de Howship	3	6,5	6,5	1,958	43,1	43,5	10,027	0,000*
	7	17,8	17,5	2,573	24,8	23	7,068	1,000
	14	3,9	4	1,197	15,7	14,5	4,398	0,145
	21	1	1	0,943	5,2	5,5	2,616	1,000
Vasos	3	25,5	25,5	1,958	0,7	0,5	0,949	0,000*
Sangüíneos	7	7,1	7	1,449	0,8	0	1,135	0,000*
	14	3,1	3	1,197	1	0	1,333	0,936
	21	3,1	3	1,101	2,1	2	1,853	1,000

FONTE: Dados da pesquisa

LEGENDA: D.P.-Desvio Padrão

NOTA: *Valores estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

TABELA 2 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DO COLÁGENO MADURO E IMATURO DE ACORDO COM O TEMPO E TESTE NÃO PARAMÉTRICO DE COMPARAÇÕES MÚLTIPAS INTERGRUPOS E NO MESMO PERÍODO DE OBSERVAÇÃO, PUCPR - 2008

Variável	Dia	Grupo Controle (n=10)			Grupo Experimental (n=10)			p
		Média	Mediana	D.P.	Média	Mediana	D.P.	
% de colágeno maduro	3	10,5	11,0	0,898	100,0	100,0	0,000	0,000*
	7	38,3	37,5	1,359	100,0	100,0	0,000	0,021*
	14	100,0	100,0	0,000	100,0	100,0	0,000	1,000
	21	100,0	100,0	0,000	100,0	100,0	0,000	1,000
% de colágeno imaturo	3	89,5	89,0	0,898	0,0	0,0	0,000	0,000*
	7	61,7	62,5	1,359	0,0	0,0	0,000	0,021*
	14	0,0	0,0	0,000	0,0	0,0	0,000	1,000
	21	0,0	0,0	0,000	0,0	0,0	0,000	1,000

FONTE: Dados da pesquisa

LEGENDA: D.P.-Desvio Padrão

NOTA: *Valores estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

FIGURAS

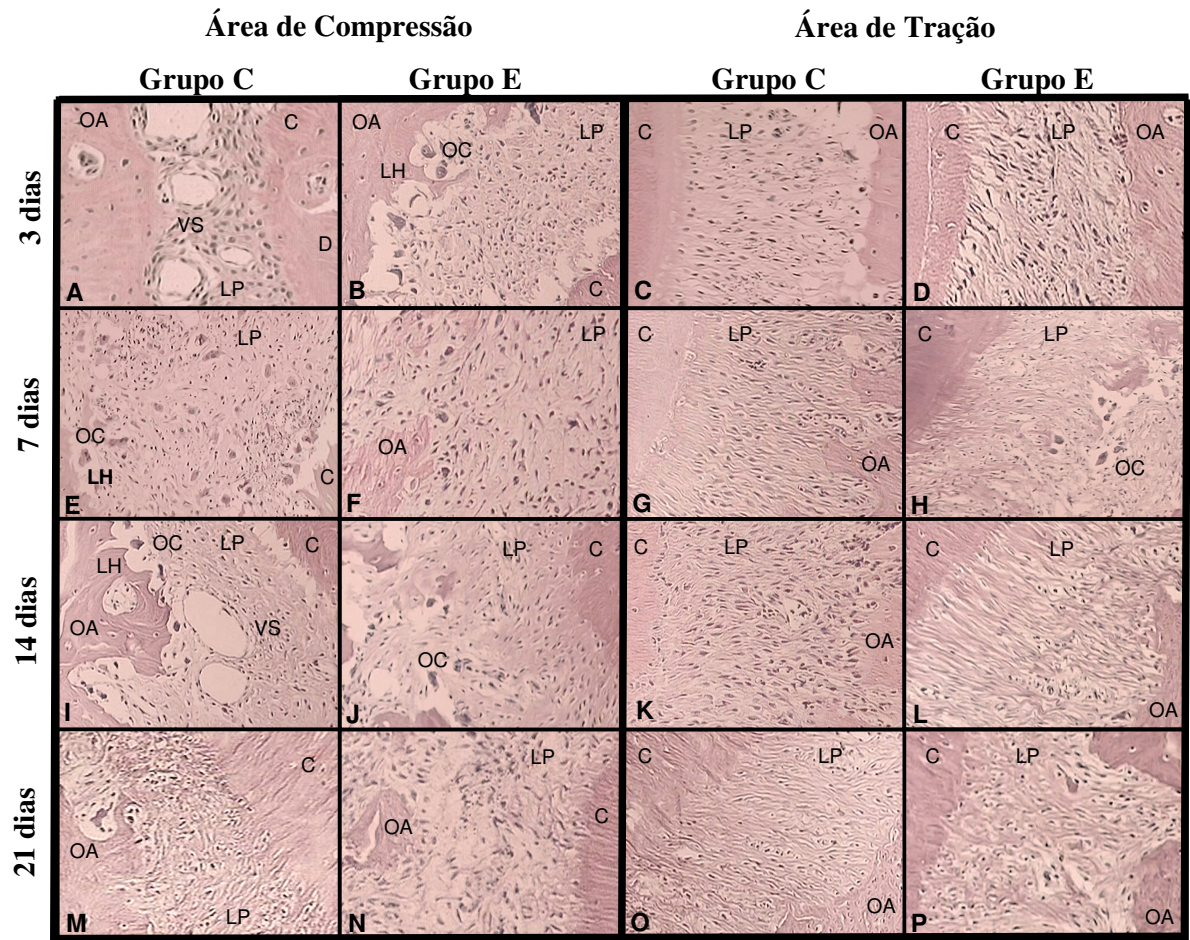


Figura 1 – Área de compressão (A, B, E, G, I, J, M, N) e tração (C, D, G, H, K, L, O, P) da raiz mesiovestibular do grupo controle no 3º (A e C), 7º (E e G), 14º (I e K) e 21º dia (M e O) e do grupo experimental no 3º (B e D), 7º (F e H), 14º (J e L) e 21º dia (N e P). Cimento (C), dentina (D), osso alveolar (OA), ligamento periodontal (LP), vaso sanguíneo (VS), osteoclasto (OC) e lacunas de Howship (LH). (H.E. - 200x).

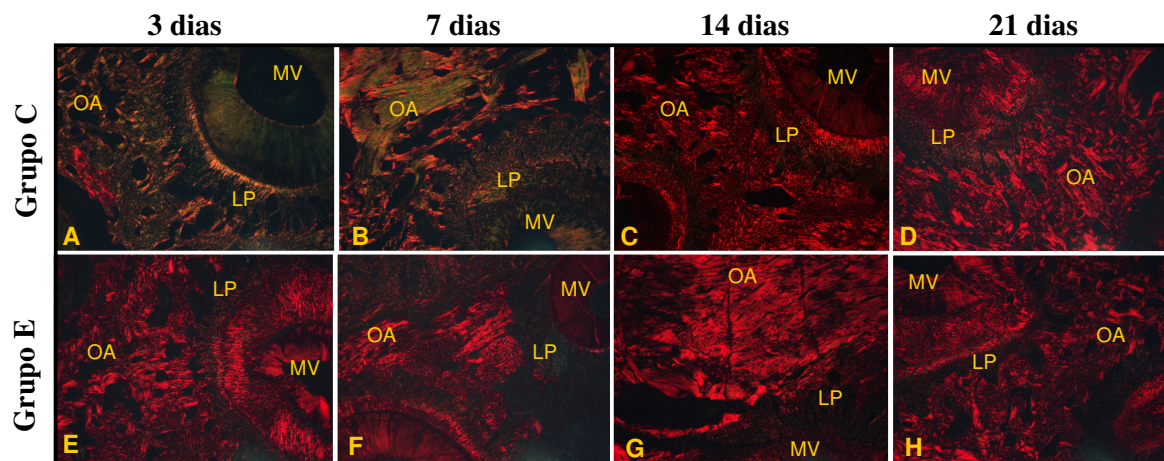


Figura 2 – Área de tração da raiz mesiovestibular (MV) do grupo controle no 3º (A), 7º (B), 14º (C) e 21º dia (D) e do grupo experimental no 3º (E), 7º (F), 14º (G) e 21º dia (H). Osso alveolar (OA), ligamento periodontal (LP). (P.S. - 100x).

2 ARTIGO EM INGLÊS

TITLE PAGE

Effect of Growth Hormone in Experimental Tooth Movement

JS Ribeiro, AMT Grégio¹, ES Camargo²

Departament of Orthodontic, Faculty of Dentistry, Catholic Pontifical University of Paraná,
Curitiba, Paraná, Brazil

¹ Departamento de Pharmacology

² Corresponding author, rua Imaculada Conceição, 1155 / 80.215-901 – Curitiba-PR – Brazil
/ Phone: 55 41 3271-1637 / Fax: 55 41 3271-1405 / e-mail: elisa.camargo@pucpr.br

Key-words: growth hormone, tooth movement, bone tissue, collagen

Number of words in the abstract: 207

Number of words in the abstract and the text: 2634

Number of tables and figures: 04

Number of cited references: 30

ABSTRACT

Effect of Growth Hormone in Experimental Tooth Movement

Bone remodeling during tooth movement is regulated by local and systemic factors. One important regulator of bone metabolism is growth hormone (GH). The aim of this research was to make a histological assessment of the GH effect during experimental tooth movement in rats. The sample was composed of 80 Wistar male rats divided into two groups: control (C) and experimental (E), with observation periods on the 3rd, 7th, 14th and 21st days. Orthodontic force (30cN) was applied by means of an appliance placed on the first right maxillary molar. In group E, 0.1UI/kg/day of GH was administered and group C received 0.5ml/kg/day of saline solution, both treatments began the day before the appliance was placed and were administered up to the time of euthanasia. The samples were processed and evaluated by light microscopy and polarized light. After statistics analyses was verified that the E group presented a larger quantity of osteoclasts on the 3rd and 7th days and Howship lacunae on the 3rd day; less quantity of blood vessels and larger quantity of mature collagen on the 3rd and 7th days than group C ($p < 0.05$). Therefore, it was concluded that GH accelerated and intensified bone resorption and produced delay in immature collagen formation during experimental tooth movement.

INTRODUCTION

Growth hormone (GH) is an important and powerful metabolic hormone that is secreted from cells in the anterior pituitary, influenced by several normal and pathophysiological conditions (Ehrnbor and Rósen, 2008). The structure was subsequently shown to consist of a single polypeptide chain of 191 amino acids with two disulphide bridges and a molecular weight of 22 kDa (Niall, 1971; Ehrnbor and Rósen, 2008) and has a half-life in the plasma of between 15 and 20 min after secretion or intravenous injection. After subcutaneous or intramuscular administration, blood concentrations of GH reach a peak between 1 and 3 h after injection and fall to undetectable levels after 24 h (Parker *et al.*, 1962).

GH is one of the most important regulatory substances in bone growth and bone remodeling (Tresguerres *et al.*, 2005). Children with various forms of GH deficiency or other defects in the GH signal-transduction pathway typically do not reach their full potential of size and stature (Albertsson-Wikland and Rosberg, 1988). Until recently, the supply of GH was so limited to treat these patients, but with the advent of the commercial application of recombinant DNA technology, had higher indication for treatment with systemic supply of GH (Lanes, 2000).

Nowadays, individuals with specific endocrinopathies, debilitations associated with AIDS, Turner Syndrome, chronic kidney failure (Carrol *et al.*, 1998; Simpson *et al.*, 2002), chronic obstructive lung disease (Pape *et al.*, 1991) and sepsis (Koea *et al.*, 1996) realizes supply with GH.

This hormone is also used illicitly and without medical supervision, to improve the performance of athletes and people training at gyms. One study has reported that 5% of male

American high-school students used or have used GH as an anabolic agent (Niall, 1971; Ehrnbor and Rósen, 2008).

Furthermore, GH may revert some changes associated with aging, which is associated with the reduction in the blood levels of this hormone, and its administration can cause increase in density and skin collagen and/or increase lean body mass, muscular mass and bone mass (Rudman *et al.*, 1990; Gibney *et al.*, 1999).

Considering its wide indication and use, as well as the consolidation of its anabolic and lipolytic effects, and its direct action on bone formation and resorption (Stracke *et al.*, 1984; Morel *et al.*, 1993; Ong *et al.*, 2001), one could question whether GH would have the competence to interfere in bone remodeling during experimental tooth movement.

GH acts directly on the proliferation and differentiation of osteoblasts (Tresguerres *et al.*, 2005) thus stimulating bone turnover, causing the increase in protein synthesis and mineralization (Marcus, 1997) and more specifically, the bone matrix proteins (Tresguerres *et al.*, 2005). However, there are no researches in the literature that show whether there is any modification in bone remodeling induced by orthodontic treatment in individuals who have GH supplementation.

Experimental tooth movement produces tissue reactions that are associated not only with local factors related to teeth and occlusion, but also with systemic factors related to bone metabolism (Verna and Melsen, 2003). In the view of this, the aim was to verify the effect of GH by the quantification of osteoclasts, Howship lacunae and blood vessels in the periodontal ligament and by the analysis of collagen maturation during experimental tooth movement in Wistar rats.

METHOD

The present study was approved through report No. 69.07 by the Ethics Committee on the Use of Animals at the Pontifical Catholic University of Paraná (PUCPR).

Eighty male rats, Wistar breed (*Rattus norvegicus albinus*), 12 weeks old, weighing approximately 300-350g were used, supplied and kept by the vivarium of PUCPR. The animals were kept in plastic cages, at temperatures between 19°C and 22°C and photoperiod of 12 hours of light and 12 hours of darkness to avoid alteration in the metabolic cycle. They were supplied with water and ration *ad libitum*.

The animals were divided randomly into 2 groups: control (C) and experimental (E). Group C received 0.9% of saline solution – 0.5 ml/kg daily (placebo) to simulate stress suffered by the animals up to the time of euthanasia after 3, 7, 14 and 21 days. Group E received 1.33 mg (4UI) of the SAIZEN® growth hormone - Serono Prods. Farms. Ltda. – Somatropina (r-hGH) - (Lot Y06A1957, Laboratoires Serono, Aubonne, Suisse). Daily applications of 0.1UI of GH/kg/day was administered subcutaneously in the abdominal area alternating between the right and left side, beginning one day before the placement of the orthodontic appliance with continuous use up to the time of euthanasia, always at the same time (Bouillon and Prodonova, 2000).

To place the orthodontic appliance, the animals were sedated with the anesthetic solution Tiletamina/Zolazepam (Zoletil 50® do Brasil Indústria e Comércio Ltda, São Paulo-SP, Virbac), at the dose of 50mg/kg of body weight and volume mean of 0.25 ml/animals. This substance was injected into the quadriceps muscle of the left lower member.

The orthodontic appliance was made from the model proposed by Heller and Nanda (1979), which consisted of a 9 mm Sentalloy closed nickel-titanium spring (G&H® Wire Company REF CCOF9XL Lot 103946 Hanover, Germany) and a 0.022 inch stainless steel

wire tie to fix the spring to the first right molar and maxillary incisors, with a force of 30cN, measured by a Dentaurem precision dynamometer (25-250g). After initial activation, the appliance was not reactivated during the experimental period; however, its position was checked daily.

The animals were euthanized by an overdose of anesthetic solution via the intraperitoneal route. After dissection and cutting of the first right maxillary molar area, the specimens were fixed in 10% buffered formalin for 72 hours and demineralized in a 4.13% EDTA solution for approximately 12 weeks. After the specimens were demineralized, 4µm thick stepped cross-sectional cuts were made from the alveolar bone crest up to the root apex. The cuts obtained were stained by the Harris and Lison hematoxylin-eosin or picrosirius method.

The hematoxylin-eosin method was used to recognize and quantify the number of blood vessels, osteoclastic cells and Howship lacunae present in the periodontal ligament adjacent to the mesio-vestibular roots of the first right maxillary molar. The slides were analyzed under light microscopy at an original magnification of 200X. The histological criteria used to identify osteoclastic cells were the presence of eosinophilic and multinucleate cells adjacent to the alveolar bone surface (Arias and Márquez-Orosco, 2006).

The slides stained with picrosirius were analyzed under polarized light microscopy at an original magnification of 100X to determine the structural changes in the collagen present in the neoformation of trabecular matrix, adjacent to the traction side of the mesio-vestibular root of the first right maxillary molar. This method allows an indirect assessment of the stage of organization of the bone matrix based on the birefringence of the collagen fiber bundles. The mature collagen fibers presented reddish tones while fibers of the immature type were yellowish-green. The analysis was performed by means of an automatic image analysis system, Image Pro-Plus version 4.5 software, which calculated the percentage of mature and

immature collagen. Measurement was performed in a randomly selected field of each section, and a mean of the percentage for each animal was calculated.

Both analyses were performed by a single, duly calibrated operator, who did not know the group to which each slide belonged.

With the view to comparing the groups among them, the Kolmogorov-Smirnov normality test, Levene test for variance homogeneity for all the variables and Kruskal Wallis test were applied.

RESULTS

On the 3rd day of the control group (C), in the compression area, periodontal ligament (PDL) with disorganized collagen fiber bundles (CF) was verified, with predominance of oval fibroblasts (FB) and intense vascularization (Fig.1A and Tab.1). An increase in the quantity of osteoclasts (OC) located inside the Howship lacunae (HL) and contiguous to the bone surface was observed. In the traction area PDL was found with stretched, oblique and parallel CF bundles among them with predominance of fusiform FB and moderate vascularization (Fig.1C and Tab.1). Under polarized light microscopy, there was preponderance of CF with irregular greenish birefringence, indicating immature collagen and the beginning of collagen matrix production (Fig.2A and Tab.2).

After the initial stage of tooth movement, the thickness of the PDL on both sides showed a trend towards normality on the 14th and 21st days. In the compression area, the CF bundles were disorganized with predominance of the oval FB (Fig.1E,1I,1M and Tab.1) while in the traction area the bundles were found to be stretched oblique and parallel among them with predominance of fusiform FB dispersed in the matrix (Fig.1G,1K,1O and Tab.1). Gradual diminishment occurred in the number of blood vessels (BV) from the 7th up to the

21st day and with predominance in the number of OC on the 7th day, which were not identified with the same frequency as in the last periods (Tab.1). In the analysis under polarized light, a greater organization and increase of mature CF with reddish coloration was observed on the 7th day. Evidence of higher levels of collagen matrix synthesis, with expression of more organized and thicker CF with yellow-reddish birefringence was found in the final stages of tooth movement (Fig.2B,2D and Tab.2) .

In group E from the 3rd to the 21st day, the compression and traction areas presented rare BV. In the compression area, the CF bundles were observed to be disorganized with predominance of the oval FB, while in the traction area the bundles were found to be stretched, oblique and parallel among them permeated by fusiform FB. The alveolar bone showed resorption units consisting of numerous OC, showing intense reabsorptive activity on the 3rd day (Fig.1B and Tab.1). Afterwards, the bone surface was found irregular with the presence of HL containing OC on the 7th and 14th day (Fig.1F,1J and Tab.1). On the 21st day occasional OC and HL were observed (Fig.1N and Tab.1). In these observation periods, under polarized light, the matrix was shown to be constituted of fibers of varying thickness with more evident organizational level than in group C, showing a greater contingent of thick reddish fibers (Fig.2E-2H and Tab.2).

DISCUSSION

The morphological characteristics of tissues and cells found in group C correspond to a typical biological response to mechanical forces produced by the orthodontic dental movement on PDL and alveolar bone, with reference to the studies of Heller and Nanda (1979) and Macapanpan *et al.* (1954). The comparison of this group with Group E shows that

the administration of GH induced dynamic changes in PDL and alveolar bone in orthodontically moved rat teeth.

It must be considered that force level of 30cN selected for this study produced excellent force, because it caused effective induction of tooth movement without causing any adverse effect in control group, such as the formation of hyaline areas (Ong *et al.*, 2000; Ong *et al.*, 2001). The time during which the appliance remained in the oral cavity was based on a previous study showing that 10 to 14 days are needed for a complete cycle of PDL bone remodeling in rats (King *et al.*, 1991).

Although GH is widely indicated and used, there are no studies reporting its effects during tooth movement.

In group E, there was predominance of OC on the 3rd day and decline in the subsequent periods with a statistically significant difference on the 3rd and 14th days when compared with group C ($p < 0.05$). These results corroborate the findings of Tresguerres *et al.* (2005), who verified an increase in bone resorption after 1 week of local application of GH in periimplant tissue.

Stracke *et al.* (1984), Morel *et al.* (1993), Hansen *et al.* (1996) and Ong *et al.* (2001) reported that GH accentuated the turnover of bone remodeling, stimulating resorption and osteoblast activation, resulting in bone neoformation.

In group E, statistically significant diminishment was observed in the quantity of BV when compared with group C on the 3rd and 7th days ($p < 0.05$). There are few studies in the literature that directly verified whether GH modulates angiogenesis, but there is evidence that when there is GH deficiency or excess, vascular function can be modified (Silha *et al.*, 2005).

The polarization method combined with computerized analysis is useful to assess the effect of GH in orthodontic dental movement and allows the correlation of the structural

organization of CF (Andrade *et al.*, 1997) with the area of primary bone osteogenesis (trabecular). The polarization method has been used as a possible indicator of collagen aggregation (Andrade *et al.*, 1997; Junqueira *et al.*, 1982), but there are no studies in the literature using the picrosirius method in experiments related to orthodontic dental movement.

In group C, morphometric analysis on the traction side showed immature CF in the initial stages, with their progressive maturation in the final stages. However, in group E only the birefringence in tones from yellow to red, indicating collagen fibers of mature bone were observed, and when compared with group C, in the periods of 3 and 7 days, statistically significant difference was shown ($p < 0.05$). However, *in vitro* studies indicate that GH can act directly on the osteoblasts and exert anabolic effects on bone formation (Stracke *et al.*, 1984; Morel *et al.*, 1993).

This divergence can be explained due to the fact that GH replacement may cause a two-phase effect having an initial predominance of bone resorption and, after 12 to 24 months of treatment, stimulation of bone neoformation with subsequent bone mass gain may occur (Simpson *et al.*, 2002; Carroll *et al.*, 1998). Considering these changes in the bone metabolism, it was noted that a long time of observation is needed to obtain bone neoformation, which was not done in this study, because the maxillary incisors used as anchorage have continuous eruption.

These results induce the hypothesis that GH could have the competence to stimulate resorption and, probably, retard the bone neoformation resulting from diminished vascularization. It is known that vascular proliferation is observed in the PDL of orthodontically moved teeth, favoring the regenerative processes characteristic of this region, and is an important mediator in the bone remodeling process (Toms *et al.*, 2000).

Therefore, it is suggested that individuals undergoing orthodontic treatment and who use GH, require longer intervals between the applications of light orthodontic forces, since the bone neoformation process is retarded, and because they present more intense bone resorption, particularly in the initial stages of administration of the drug. Another recommendation would be to begin orthodontic treatment after the initial stage of GH administration, since it stimulates bone formation only after 12 to 24 months. Radiographic control must be frequently made to assess the standard of bone resorption.

It was concluded that GH accelerated and intensified bone resorption and caused retardation of immature collagen formation after experimental tooth movement in rats.

REFERENCES

- Albertsson-Wikland K, Rosberg S (1988) Analyses of 24-hour growth hormone profiles in children: relation to growth. *J Clin Endocrinol Metab* 67(3): 493-500.
- Andrade GB, Riet-Correa F, Montes CN, Battlehner CN, Saldiva PHN (1997) Dating of fibrotic lesions by the picosirius-polarization method. an application using the lesions of lechiguana (bovine focal proliferative fibrogra nulomatous panniculitis). *Eur J Histochem* 41(3):203-209.
- Arias OR, Marquez-Orosco MC (2006) Aspirin, acetaminophen, and ibuprofen: their effects on orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 130(3):364-370.
- Bouillon R, Prodonova A (2000) Growth and hormone deficiency and peak bone mass. *J Pediatr Endocrinol Metab* 13(Suppl 6):1327-36.
- Carroll PV, Christ ER, Bengtsson BA, Carlsson L, Christiansen D, Clemmons D, Hintz R, Ho K, Laron Z, Sizonenko P, Sonksen PH, Tanaka T, Thorner M (1998) Growth hormone deficiency in adulthood and the effects of growth hormone replacement: a review. *J Clinical Endocrinol Metab* 83(2):382-395.
- Ehrnbor C, Rosén T (2008) Physiological and pharmacological basis for the ergogenic effects of growth hormone in elite sports. *Asian J Androl* 10(3):373–383.
- Gibney J, Wallace JD, Spinks T, Schnorr L, Ranicar A, Cuneo RC, Lockhart S, Burnand KG, Salomon F, Sonksen PH, Russell-Jones D (1999) The Effects of 10 Years of Recombinant Human Growth Hormone (GH) in Adult GH-Deficient Patients. *J Clin Endocrinol Metab* 84(8):596-602.
- Guicheux J, Gauthier O, Aguado E, Pilet P, Couillaud S, Jegou D, Daculsi G, Heymann D (1998) Human growth hormone locally released in bone sites by calcium-phosphate biomaterial stimulates ceramic bone substitution without systemic effects: a rabbit study. *J Bone Miner Res* 13(4):739-748.
- Hansen TB, Brixen K, Vahl N, Jorgensen JOL, Christiansen JS, Mosekilde L, Hagen C (1996) Effects of 12 Months of Growth Hormone (GH) Treatment on Calciotropic Hormones, Calcium Homeostasis, and Bone Metabolism in Adults with Acquired GH

Deficiency: A Double Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study. *J Clin Endocrinol Metab* 81(9):3352–3359.

Heller IJ, Nanda R (1979) Effect of metabolic alteration of periodontal fibers on orthodontic tooth movement. An experimental study. *Am J Orthod* 75(3):239-258.

Junqueira LCU, Montes GS, Sanches EM (1982) The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the picrosirius-polarization method. *Histochemistry* 74(1):153-156.

King GJ, Keeling SD, Wronski TJ (1991) Histomorphometric study of alveolar bone turnover in orthodontic tooth movement. *Bone* 12(6):401-409.

Koea JB, Breier BH, Douglas RG, Gluckman PD, Shaw JHF (1996) Anabolic and cardiovascular effects of recombinant human growth hormone in surgical patients with sepsis. *Brit J Surg* 83(2):196-202.

Lanes R (2000) Growth velocity, final height and bone mineral metabolism of short children treated long term with growth hormone. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 1(1):33-46.

Macapanpan LC, Weinmann JP, Brodie AG (1954) Early tissue changes following tooth movement in rats. *Angle Orthod* 24(02):79-95.

Marcus R (1997) Skeletal effects of growth hormone and IGF-I in adults. *Horm Res* 48(suppl5):60-64.

Morel G, Chavassieux P, Barenton B, Dubois PM, Meunier PJ, Boivin G (1993) Evidence for a direct effect of growth hormone on osteoblasts. *Cell Tissue Res* 273(2):279-286.

Niall HD (1971) Revised Primary Structure for Human Growth Hormone. *Nature New Biol* 230(11):90–91.

Ong CKL, Walsh LJ, Harbrow DJ, Taverne TA, Symons AL (2000) Osseous morphology and spatial relationships of the temporomandibular joint: comparisons of normal and anterior disc positions. *Angle Orthod* 70(1):118-125.

Ong CKL, Joseph BK, Waters MJ, Symon AL (2001) Growth Hormone Receptor and IGF-I Receptor Immunoreactivity During Orthodontic Tooth Movement in the Prednisolone-Treated Rat. *Angle Orthod* 71(6):486-493.

Pape GS, Friedman M, Underwood LE, Clemmons DR (1991) The effect of growth hormone on weight gain and disease pulmonary function in patients with chronic obstructive lung disease. *Chest* 99(6):1495-1500.

- Parker ML, Utiger RD, Daughaday WH (1962) Studies on human growth hormone. II. the physiological disposition and metabolic fate of human growth hormone in man. *J Clin Invest* 41(2):262–268.
- Rickert VI, Pawlak-Morello C, Sheppard V, Jay MS (1992) Human Growth Hormone: A New Substance Of Abuse Among Adolescents? *Clin Pediatr* 31(12):723–726.
- Rudman D, Feller AG, Nagraj HS, Gergans GA, Lalitha PY, Goldberg AF, Schlenker RA, Cohn L, Rudman IW, Mattson DE. (1990) Effects of human growth hormone in men over 60 years old. *N Engl J Med* 323(1):1–6.
- Silha JV, Krsek M, Hana V, Marek J, Weiss V, Jezkova J, Rosickat M, Jarkovska Z, Murphy LJ (2005) The effects of growth hormone status on circulating levels of vascular growth factors. *Clinical Endocrinology* 63(1):79–86.
- Simpson H, Savine R, Sonksen P, Bengtsson BA, Carlsson L, Christiansen JS, Clemmons D, Cohen P, Hintz R, Ho K, Mullis P, Robinson I, Strasburger C, Tanaka T, Thorner M (2002) Growth hormone replacement therapy for adults: Into the new millennium. *Growth Hormone & IGF Research* 12(1):1–33.
- Stracke H, Schulz A, Moeller D, Rossol S, Schatz H (1984) Effect of growth hormone on osteoblasts and demonstration of somatomedin-C/IGF I in bone organ culture. *Acta Endocrinol* 107(1):16-24.
- Toms A, Gannon B, Carati C (2000) The immunohistochemical response of the rat periodontal ligament endothelium to an inflammatory stimulus. *Austr Orthod J* 16(2):61-68.
- Tresguerres IF, Alobera MA, Baca R, Tresguerres JAF (2005) Histologic, morphometric, and desitometric study of peri-implant bone in rabbits with local administration of growth hormone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 20(2):193-202.
- Verna C, Melsen B (2003) Tissue reaction to orthodontic tooth movement in different bone turnover conditions. *Orthod Craniofac Res* 6(3):155-163.

TABLES

TABLE 1 – DESCRIPTIVE STATISTICS OF VARIABLES ACCORDING WITH THE MOMENT AND NON-PARAMETRIC TEST WITH MULTIPLE COMPARISONS INTERGROUPS AND EQUAL OBSERVATIONS PERIODS, PUCPR - 2008

Variable	Day	Control Group (n=10)			Experimental Group (n=10)			p
		Mean	Median	S.D.	Mean	Median	S.D.	
Cells Like-Osteoclasts	3	6,3	6,5	1,337	31,2	31,5	3,225	0,000*
	7	16,9	17	3,348	19	19	4,714	1,000
	14	3,3	3,5	1,059	14,8	14	2,348	0,036*
	21	1,4	1	1,265	5,3	6	2,359	1,000
Howship Lacunae	3	6,5	6,5	1,958	43,1	43,5	10,027	0,000*
	7	17,8	17,5	2,573	24,8	23	7,068	1,000
	14	3,9	4	1,197	15,7	14,5	4,398	0,145
	21	1	1	0,943	5,2	5,5	2,616	1,000
Blood Vessels	3	25,5	25,5	1,958	0,7	0,5	0,949	0,000*
	7	7,1	7	1,449	0,8	0	1,135	0,000*
	14	3,1	3	1,197	1	0	1,333	0,936
	21	3,1	3	1,101	2,1	2	1,853	1,000

SOURCE: Research data

CAPTION: S.D.-Standart Deviation

NOTE: *Values statistically significant when $p < 0,05$.

TABLE 2 – DESCRIPTIVE STATISTICS OF MATURE AND IMMATURE COLLAGEN, ACCORDING WITH THE TIME AND NON-PARAMETRIC TEST WITH MULTIPLE COMPARISONS INTERGROUPS AND EQUAL OBSERVATIONS PERIODS, PUCPR - 2008

Variable	Day	Control Group (n=10)			Experimental Group (n=10)			p
		Mean	Median	S.D.	Mean	Median	S.D.	
% mature collagen	3	10,5	11,0	0,898	100,0	100,0	0,000	0,000*
	7	38,3	37,5	1,359	100,0	100,0	0,000	0,021*
	14	100,0	100,0	0,000	100,0	100,0	0,000	1,000
	21	100,0	100,0	0,000	100,0	100,0	0,000	1,000
% immature collagen	3	89,5	89,0	0,898	0,0	0,0	0,000	0,000*
	7	61,7	62,5	1,359	0,0	0,0	0,000	0,021*
	14	0,0	0,0	0,000	0,0	0,0	0,000	1,000
	21	0,0	0,0	0,000	0,0	0,0	0,000	1,000

SOURCE: Research data

CAPTION: S.D.-Standart Deviation

NOTE: *Values statistically significant when $p < 0,05$.

FIGURES

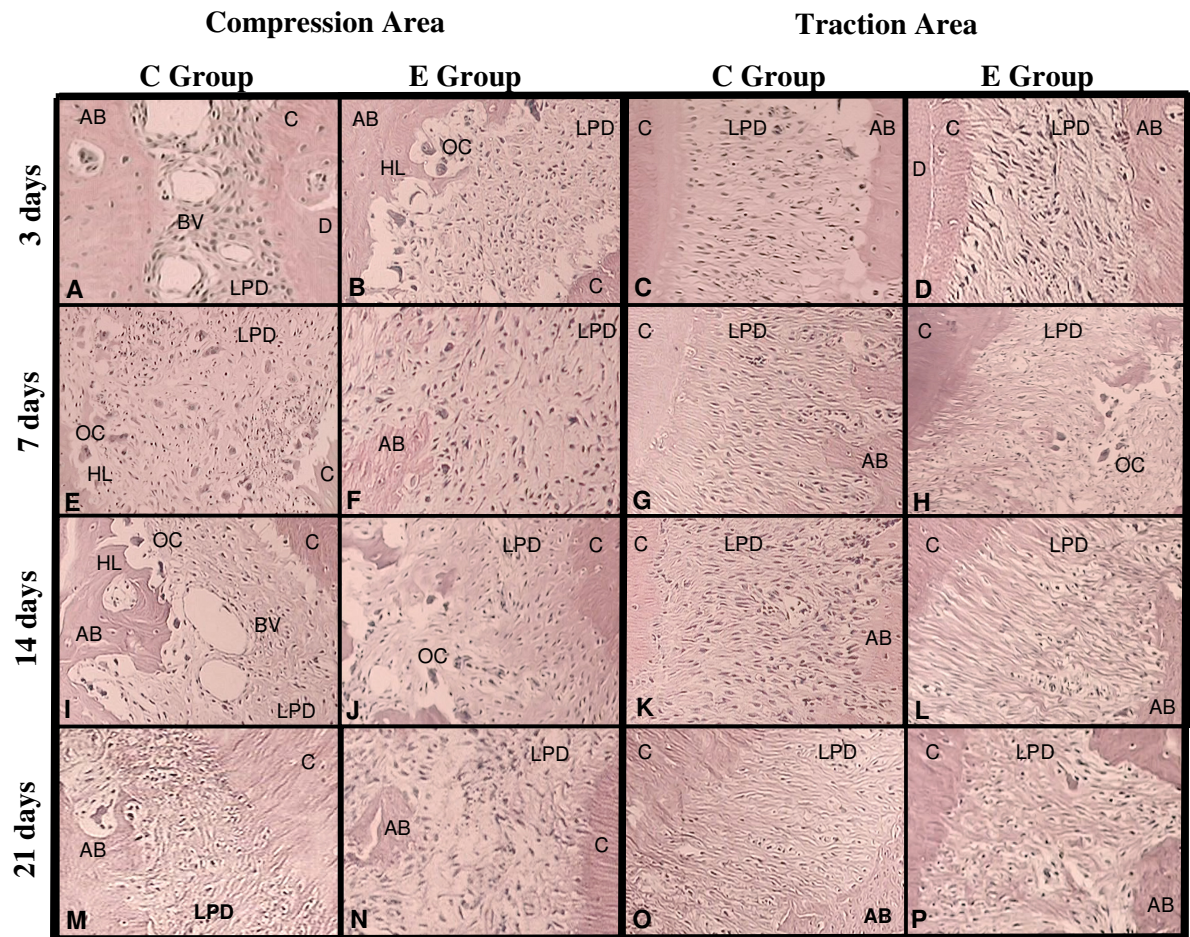


Figure 1 – Compression (A, B, E, G, I, J, M, N) and traction area (C, D, G, H, K, L, O, P) of mesio-vestibular roots of control group in 3° (A, C), 7° (E, G), 14° (I, K), 21° day (M, O) and of experimental group in 3° (B, D), 7° (F, H), 14° (J, L) and 21° day (N, P). Cementum (C), dentine (D), bone alveolar (BA), periodontal ligament (PDL), blood vessel (BV), osteoclast (OC) and Howship lacunae (LH). (H.E. - 200x).

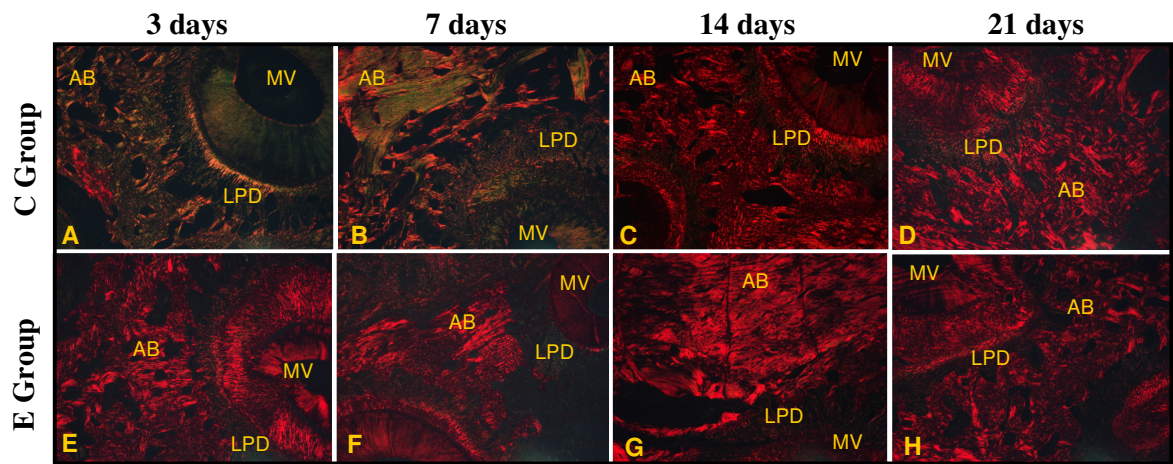


Figure 2 – Traction área of mesio-vestibular roots (MV) of control group in 3° (A), 7° (B), 14° (C) and 21° day (D) and experimental group in 3° (E), 7° (F), 14° (G) and 21° day (H). Alveolar bone (AB), periodontal ligament (LPD). (P.S. - 100x).

2 ANEXOS

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Curitiba, 10 de julho de 2007.

PARECER N. 69.07/CEUA-PUCPR

Prezado (a) Pesquisador (a)

Informo a Vossa Senhoria que o Comitê de Ética No Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, em reunião, realizada no dia 25 de junho do corrente ano avaliou o Projeto Intitulado "Atuação de Medicamentos Sistêmicos no movimento dentário induzido em Ratos", sob o registro no CEUA /PUCPR nº 241

O experimento classificado como de categoria C, será realizado com 144 *Ratus norvegicus albinus*, que ao final do experimento serão eutanasiados.

O colegiado do CEUA entendeu que o projeto avaliado está de acordo com as normas éticas vigentes no país e por isso emite o seguinte parecer:

APROVADO

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

Atenciosamente,


Prof.ª Graciela Maria D'Almeida e Oliveira
Presidente do Comitê de Ética No Uso de Animais da PUCPR

Ilma Sra.
Elisa Souza Camargo

ANEXO 2 - 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 nº 241, tendo sido aprovado, parecer nº 69.07.

Seleção da Amostra

A amostra foi constituída por 80 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) com 9 semanas de vida, pesando aproximadamente entre 300 a 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 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.

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

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).

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).

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

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

Administração da Droga

O fármaco utilizado foi SAIZEN® 1,33 mg (4UI) - Serono Prods. Farms. Ltda. – Somatropina (r-hGH) - (Lote Y06A1957, Fabricação: 02/07, Validade: 01/09, Registro 1.1124.0184, Laboratoires Serono, Aubonne, Suisse).

Foram realizadas aplicações diárias de 0,1UI de GH/kg/dia (Bouillon; Prodonova, 2000⁴; Mac Gillivray et al., 1998⁵), via subcutânea na região abdominal alternando entre o lado direito e esquerdo, iniciando um dia antes da instalação do acessório ortodôntico e prosseguindo com uso contínuo até o final do experimento, 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.

Distribuição da Amostra

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos, controle (C) e experimental (HC), com a finalidade de caracterizar a evolução do movimento dentário induzido ao longo do tempo. O grupo de dentes estudado foi composto pelos primeiros molares superiores do lado direito.

Grupo Controle: Contendo quarenta animais eutanasiados após três, sete, catorze e vinte e um dias de movimento dentário induzido, sob administração de solução salina a 0,9% - 0,5ml/kg (placebo).

Grupo Experimental: Contendo quarenta animais eutanasiados após três, sete, catorze e vinte e um dias de movimento dentário induzido, sob administração de SAIZEN® 1,33 mg (4UI) - 0,1UI de GH/kg/dia.

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.

Preparo do Acessório Ortodôntico

O acessório ortodôntico foi construído a partir do modelo proposto por Heller e Nanda (1979)⁶ consistiu-se de em uma mola de níquel-titânio fechada de 9mm (G&H[®] Wire Company) e fio de amarrilho de aço inoxidável com 0,022 polegada, para fixação da mola no primeiro molar e no incisivo superior (Figura 1H).

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/animais. 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 (Figura 1A), 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 do incisivo superior direito e mesial no molar superior direito. Para fixar esta mola ao primeiro molar, amarrilho de aço de 0,022 polegadas 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 (Figura 1B). 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 (Figura 1C) e ao mesmo tempo fixando uma das extremidades da

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

mola (Figura 1D). A outra extremidade foi unida aos incisivos superiores, por meio de fio de amarrilho 0,022 polegada e resina composta (Figura 1E-G). 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. Uma força inicial de 30cN, mensurada por dinamômetro de precisão, devidamente calibrado e aferida, da marca Dentaurum, modelo *Stress and tension gauge* (25 a 250cN), foi adicionada.

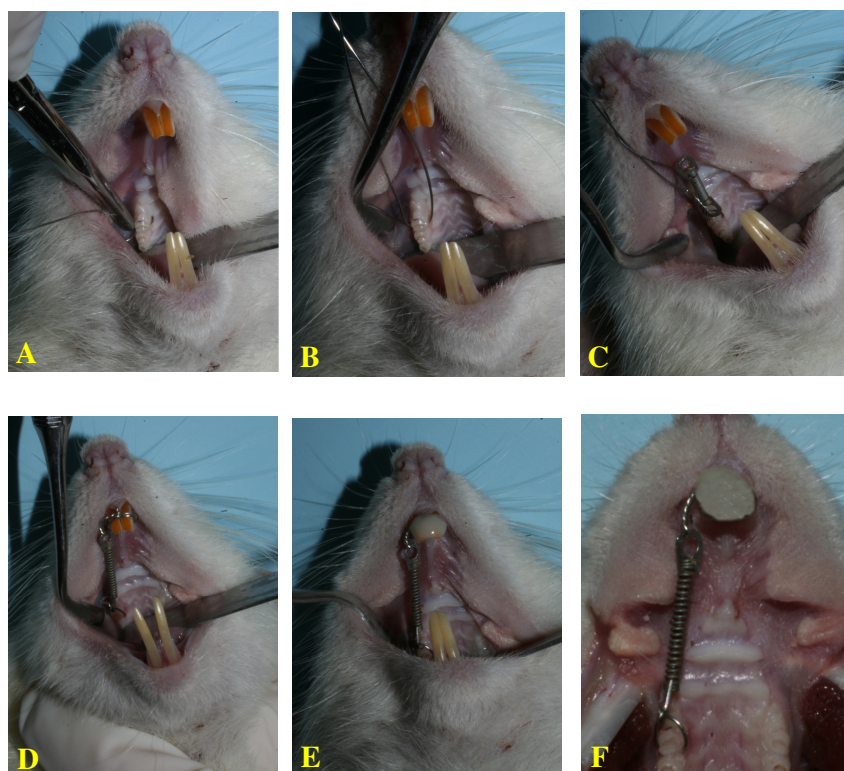


Figura 1 –Inserção do fio de amarrilho de aço 0,022'' por vestibular e pelo espaço interproximal entre o primeiro e segundo molar superior direito (A), fixação da mola, com o fio de amarrilho circundando a coroa do primeiro molar (B) e fixando uma das extremidades da mola (C). União da outra extremidade ao incisivo superior do mesmo lado (D), fixação com resina composta (E), dispositivo instalado (F).

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

Eutanásia dos animais, Obtenção e Preparo dos Espécimes

Os animais foram eutanasiados por dose excessiva de solução anestésica, via intraperitoneal.

Após constatada a eutanásia 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 transversos, desde a crista óssea até o ápice radicular, de 4µm de espessura pudessem ser realizados. Cortes com intervalo de 250µm entre si foram montados em lâminas de vidro para serem preparados e corados pelo método de hematoxilina-eosina de Harris e Lison ou método de picrosírius. 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. O critério histológico utilizado para identificar células osteoclásticas foi a presença de células eosinofílicas e multinucleadas adjacentes a superfície do osso alveolar (Arias and Márquez-Orosco, 2006⁷) e as lacunas de Howship foram consideradas ativas quando estavam próximas às células osteoclásticas.

As lâminas coradas por Picrosírius foram analisadas sob microscopia de luz polarizada, com aumento original de 100X, para determinar as mudanças estruturais no colágeno presente na neoformação da matriz trabecular, adjacente ao lado de tração. Este método permite uma avaliação indireta do estágio de organização da matriz óssea baseada na birrefringência dos feixes de fibras do colágeno. A análise foi realizada por meio de um sistema de análise de imagens automático do *software* Image Pro-Plus versão 4,5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), que calculou a porcentagem de colágeno maduro e imaturo. A mensuração foi realizada em um campo selecionado aleatoriamente de cada secção, sendo realizada uma média da porcentagem para cada animal.

Ambas análises foram realizadas por um único operador devidamente calibrado que desconhecia o grupo que cada lâmina pertencia.

⁷ Arias, O.R. and Marquez-Orosco, M.C. (2006) *Am. J. Orthod. Dentofacial. Orthop.*, **130**(3), 364-370.

ANEXO 3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

TABELA 1 - TESTE DE NORMALIDADE DE KOLMOGOROV-SMIRNOV PARA TODOS OS GRUPOS ESTUDADOS, PUCPR - 2008

Grupo	Dia	Osteoclastos			Lacunas de Howship			Vasos Sanguíneos		
		Estatística	n	Valor p	Estatística	n	Valor p	Estatística	n	Valor p
Controle	3	0,200	10	0,200*	0,199	10	0,200*	0,178	10	0,200*
	7	0,112	10	0,200*	0,169	10	0,200*	0,172	10	0,200*
	14	0,246	10	0,089*	0,174	10	0,200*	0,233	10	0,131*
	21	0,224	10	0,168*	0,256	10	0,063*	0,264	10	0,047
Experimental	3	0,155	10	0,200*	0,166	10	0,200*	0,276	10	0,030
	7	0,116	10	0,200*	0,201	10	0,200*	0,359	10	0,001
	14	0,333	10	0,002	0,273	10	0,034	0,373	10	0,000
	21	0,217	10	0,200*	0,189	10	0,200*	0,171	10	0,200*

FONTE: Dados da pesquisa

NOTA: *Distribuição normal para $p > 0,05$.

TABELA 2 - TESTE DE HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIA DE LEVENE PARA AS VARIÁVEIS OSTEOCLASTOS, LACUNAS DE HOWSHIP E VASOS SANGUÍNEOS, PUCPR - 2008

Variável	Estatística	G.L.1	G.L.2	Valor p
Osteoclastos	3,457	7	72	0,003
Lacunas de Howship	9,403	7	72	0,000
Vasos Sanguíneos	2,487	7	72	0,024

FONTE: Dados da pesquisa

LEGENDA: G.L.-Graus de Liberdade

NOTA: *Homogeneidade de variância para $p > 0,05$.

TABELA 3 - TESTE DE KRUSKAL WALLIS PARA AS VARIÁVEIS OSTEOCLASTOS, LACUNAS DE HOWSHIP E VASOS SANGUÍNEOS, PUCPR - 2008

Variável	Dia	Rank		Valor p
		Grupo Controle	Grupo Experimental	
Osteoclastos	3	31,15	75,40	0,000*
	7	56,10	59,90	
	14	17,15	50,60	
	21	7,70	26,00	
Lacunas de Howship	3	30,60	74,60	0,000*
	7	54,90	63,25	
	14	20,20	49,25	
	21	6,30	24,90	
Vasos Sanguíneos	3	75,50	19,35	0,000*
	7	65,10	19,80	
	14	44,00	21,90	
	21	44,95	33,40	

FONTE: Dados da pesquisa

NOTA: *Valores estatisticamente significantes quando $p < 0,05$

TABELA 4 - TESTE DE NORMALIDADE DE KOLMOGOROV-SMIRNOV PARA TODOS OS GRUPOS ESTUDADOS, PUCPR - 2008

Grupo	Dia	% de colágeno maduro			% de colágeno imaturo		
		Estatística	n	Valor p	Estatística	n	Valor p
Controle	3	0,170	10	0,200*	0,170	10	0,200*
	7	0,135	10	0,200*	0,135	10	0,200*
Experimental	3	0,155	10	0,200*	0,166	10	0,200*
	7	0,116	10	0,200*	0,201	10	0,200*

FONTE: Dados da pesquisa

NOTA: *Distribuição normal para $p > 0,05$; % de colágeno maduro e imaturo é constante no 14º e 21º dia, implicando que os dados não apresentam distribuição normal

TABELA 5 - TESTE DE HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIA DE LEVENE PARA AS VARIÁVEIS % DE COLÁGENO MADURO E IMATURO, PUCPR - 2008

Variável	Estatística	G.L.1	G.L.2	Valor p
% de colágeno maduro	2,623	1	18	0,123
% de colágeno imaturo	2,623	1	18	0,123

FONTE: Dados da pesquisa

LEGENDA: G.L. - Graus de Liberdade

NOTA: *Homogeneidade de variância para $p > 0,05$

TABELA 6 - TESTE DE KRUSKAL WALLIS PARA AS VARIÁVEIS % DE COLÁGENO MADURO E IMATURO, PUCPR - 2008

Variável	Dia	Rank		Valor p
		Grupo Controle	Grupo Experimental	
% de colágeno maduro	3	5,50	50,50	0,000*
	7	15,50	50,50	
	14	50,50	50,50	
	21	50,50	50,50	
% de colágeno imaturo	3	75,50	30,50	0,000*
	7	65,50	30,50	
	14	30,50	30,50	
	21	30,50	30,50	

FONTE: Dados da pesquisa

NOTA: *Valores estatisticamente significantes quando $p < 0,05$

ANEXO 4 - ILUSTRAÇÕES

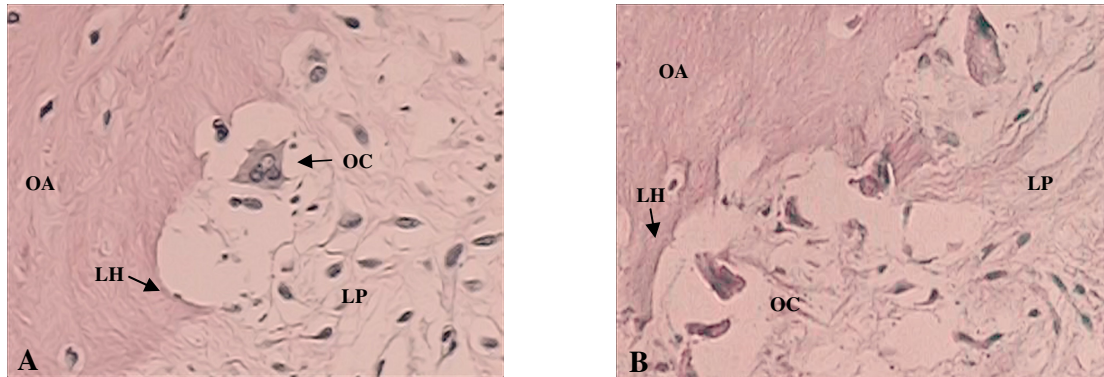


Figura 2 – Maior aumento da área da superfície do ligamento periodontal (LP) e osso alveolar (OA) evidenciando osteoclasto (OC) adjacente a lacunas de Howship (LH). (H.E. – 400x)

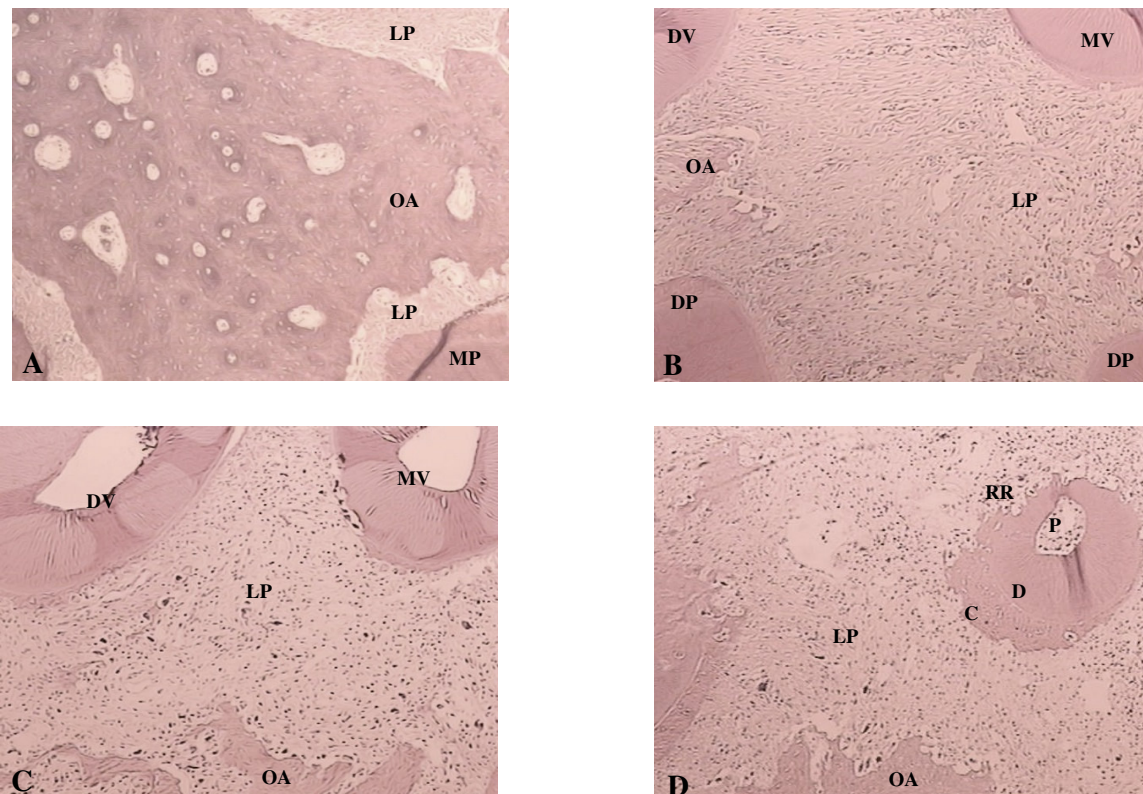


Figura 3 – Reabsorção óssea entre as raízes mesiovestibular (MV), mesiopalatina (MP), disto vestibular (DV) e distopalatina (DP) do primeiro molar superior do grupo controle (A) e experimental 7 dias (B) e 14 dias (C). Aumento do ligamento periodontal (LP) entre as raízes. Reabsorção radicular (RR) no grupo experimental no 7º dia (D). Cimento (C), dentina (D), polpa (P), osso alveolar (OA). (H.E. – 100x).

ANEXO 5 – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO *JOURNAL OF DENTAL RESEARCH*

JOURNAL OF DENTAL RESEARCH - INSTRUCTIONS TO CONTRIBUTORS - GENERAL POLICY

Submitted manuscripts must be written clearly and concisely in English and represent unpublished original research that is not being considered for publication elsewhere. The *Journal* seeks to publish (i) concise definitive reports of wide interest to the research community and (ii) topical, concise reviews of the state of the art. Concise definitive reports of findings of unusual significance can be reviewed as (iii) Rapid Communications. Criteria for the acceptance of Rapid Communications will be more stringent than those for regular papers. Authors should request review for Rapid Communications in the cover letter to the Editor. The *Journal* also welcomes (iv) essays that explore seminal events and creative advances in the development of dental research for publication in the "Discovery!" column.

Reports of observations and the development of new methods or techniques may be considered for publication if they are of broad and fundamental interest, but the focus of the *Journal* is on definitive reports demonstrating cause-and-effect relationships. Submission of case reports is generally discouraged.

Letters to the Editor must include evidence to support a position about the scientific or editorial content of the *Journal* and are limited to 250 words. Guest Editorials describe a clear and substantiated position on issues of interest to the community and are also encouraged. These are limited to 1000 words. As appropriate, a brief response to Letters or Guest Editorials will be solicited for concurrent publication. Conference Reports will be considered for publication only if they are topical and brief, highlighting important new data or findings. Final approval for publication rests with the Editor.

Authors considering submitting a Conference Report should first consult the Editor regarding the suitability of the report. Such reports should: (a) be of broad and international interest to the readership of the *JDR*; (b) include the specific aims of the meeting, the pertinent information provided by the speakers (i.e., summary of a few sentences from each talk), then the specific conclusions; and (c) meet the same word limits and figure/table numbers as a regular research report. An abstract is not required. Priority for publication would depend on our publishing schedule for regular research reports, which generally carry higher priority.

Submitted manuscripts must be accompanied by a cover letter with the signatures of all authors certifying that the research is (i) original, (ii) not presently under consideration for publication elsewhere, (iii) free of conflict of interest (e.g., edited by the funding agency or organization), and (iv) conducted by the highest principles of human subject and animal welfare. In the cover letter, contributors should nominate four expert, independent scientific referees and include their names, mailing addresses, telephone/FAX numbers, e-mail addresses, and area of expertise. It is highly encouraged that referees be nominated to avoid delays in the review process. Nominated scientific referees may not be colleagues at the contributors' institutions or present or former collaborators. The receipt of all manuscripts will be acknowledged. The contributors will be notified subsequently by the Editor of (1) acceptance, (2) need for revisions, or (3) rejection.

Also include a list of total words (from Abstract to Acknowledgments), number of words in Abstract, total number of tables and/or figures, and number of references.

All rights in manuscripts shall be transferred to the *Journal of Dental Research* upon submission. Submission of a manuscript shall constitute each author's agreement that the *Journal of Dental Research* holds all proprietary

rights in the manuscript submitted, including all copyrights. On acceptance and before publication of a paper, contributors will be asked to sign a formal transfer of copyright.

For clarity, please use only common abbreviations, which will be widely recognized by the more general reader of the Journal. A list of all abbreviations used should be provided on the manuscript cover page.

RESEARCH REPORTS

(All submissions must adhere to the following criteria.) These will be limited to a maximum of 2500 words (including abstract, introduction, materials & methods, results, discussion, and acknowledgments, but excluding the reference list and figure legends), an abstract containing a maximum of 150 words, a maximum of 35 references, and a combined total of 4 tables/figures. Additional supporting data may be referenced as a supplemental appendix for publication online only. The appendix must be submitted with the manuscript for review. Research Reports will be published in three categories: Clinical, Biomaterials & Bioengineering and Biological.

CONCISE REVIEWS

With the addition of content from the journal *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, the 'Concise Review' category in *JDR* will be discontinued, and manuscripts for Concise Reviews will no longer be considered.

CRITICAL REVIEWS IN ORAL BIOLOGY & MEDICINE

Critical Reviews in Oral Biology & Medicine manuscripts cannot be submitted online. Authors must contact the *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* editor, Dr. Dana Graves, at dgraves@iadr.org for submission instructions.

The manuscript should briefly summarize information that is well known and emphasize recent developments over the last three years. This will help focus the manuscript on cutting edge research. Please stress critical issues and concepts that would add excitement to the article. In addition, visual elements should be added to make the manuscript as "approachable" as possible. The manuscript should follow the following guidelines:

- It is important to include several illustrations or diagrams to enhance clarity. Manuscripts that lack figures or diagrams typically receive a low priority score. The cost of color figures in the print version will be borne by the authors and are approximately \$1000 per figure. However, there are no charges for figures and diagrams printed in black and white. Color figures may be included in the on-line version of *JDR* with no extra charges.
- Summarize important concepts in tables or flow charts or show critical data in the form of figures. Please note that you will need to obtain permission to reproduce a previously published figure or table.
- The length of the article with references and tables/figures should be approximately 35-40 double spaced, 8 X 11 inch typed pages with a 12 font size. The page limitation is enforced by the Journal. In addition, there should be as few abbreviations as possible. Due to the broad readership abbreviations commonly recognized in one field may not be readily apparent to those in a different field.
- The cover page, abstract (~200 words), text, summary, figure legends and tables should be combined into a single Word document and the Figures sent as a PDF file containing all figures. If the on-line version is to be in color and the printed version in B&W please submit separate PDF files for B&W and color figures. Note that the figures in both PDF files should be identical except that the B&W is in grayscale.

- Examples of recent review articles in JDR may be found at the following links: <http://jdr.iadrjournals.org/cgi/content/full/86/9/800> or <http://jdr.iadrjournals.org/cgi/content/full/85/7/584>

DISCOVERY! ESSAYS

Readers are encouraged to submit *Discovery!* essays/articles that they feel will be of interest to the *JDR* readership. Authors are welcome to submit manuscripts for consideration directly to the Discovery! editor, Dr. Marty Taubman, at mtaubman@forsyth.org, or by mail to Dr. Marty Taubman, c/o The Forsyth Institute, 140 The Fenway, Boston, MA 02115, USA. Discovery! manuscripts cannot be submitted online. Discovery! manuscripts will be limited to 2500 words and two tables or figures.

MANUSCRIPTS

Prepare manuscript, tables, legends, and footnotes as double-spaced text (a minimum of 6 mm between lines) formatted for 8-1/2 x 11-inch paper. Top, bottom, and side margins should be one inch, with no indented paragraphs. Figures and tables should not exceed 8-1/2 x 11 inches. Both Macintosh (Framemaker, MacWrite, Word, WordPerfect, Works WP, or WriteNow) and IBM PC (DCA-RFT, FrameMaker, MultiMate, Office Writer, Text, Word for Windows, WordPerfect, WordStar, Works WP, or XYWrite) files will be accepted. Manuscripts should be "clean", i.e., free of tabs and codes. Bold and italic type should appear exactly as they will appear on the printed page. Italicize items that will appear in italics; this will include the genus and species of an organism, g (for gravitational force), Latin words and abbreviations (for example, e.g., i.e., in vitro, in vivo, et al.), and journal names in the References section. Tabs should be used to separate columns within tables.

Do not use elaborate table formatting.

Use a standard font such as Times New Roman or Arial to avoid misrepresentation of your data on different computers that do not have the unusual or foreign language fonts.

Title and Section Headings

Bold type should be used for the title on page 1. Use upper- and lower-case letters. First-level headings, which include ABSTRACT, INTRODUCTION, MATERIALS & METHODS, RESULTS, DISCUSSION, ACKNOWLEDGMENTS, and REFERENCES should be bold type, all upper-case letters, as shown. Second-level subheads should be bold type, upper- and lower-case. Third-level subheads should be bold type, upper- and lower-case, with a paragraph indent. Any lower-ranked subheads should be italicized, and in upper- and lower-case. Please type no more than 10 characters per inch. Authors are reminded to include their complete mailing addresses, telephone, FAX, and e-mail addresses, as available. Copies of "in press" and "submitted" manuscripts that will provide essential information for the referees should also be enclosed.

A Few Words About Style

Authors should remember that they are writing to communicate to often-uninformed readers. Here are a few suggestions: Show a clear chronological progression and logic to the development of your ideas throughout the manuscript and within paragraphs and sentences. Speak to the reader in a direct and straightforward voice. Tell the reader your purpose, then provide background, data, and conclusions. You will make your point most effectively by illustrating with a well-chosen example, rather than providing an encyclopedic discourse. In each paragraph and sentence, stick to the subject. For example, if the subject is "biophysical properties", don't write sentences in that paragraph that change the subject to the names of cited contributors. Each sentence should contain only one thought. Write short and simple sentences. Choose the best word so that you say what you mean. To make your information accessible to the widest possible audience, avoid jargon, acronyms, and

needless words. Before submission, contributors must review their manuscripts with (i) computer grammar and spelling tools/filters and (ii) a colleague who is expert in English language grammar and syntax. Manuscripts may be returned without review or rejected on the basis of poor English or accepted standards of style. Check to ensure that all listed references, figures, and tables are cited in the text and that all cited references, figures, and tables are presented in appropriate sections. The Editor reserves the right to make changes to improve the clarity of the text. All such changes will be subject to contributors' approval before publication.

Revised Manuscripts

All revisions must be accompanied by a cover letter signed by all authors to the Editor. The letter must (i) detail on a point-by-point basis the contributors' disposition of each of the referees' comments, and (ii) certify that all contributors approve of the revised content and that the manuscript complies with stipulations 'i' through 'iv' in "General Policy". Responses to separate reviewers should be on separate pages. Also include a copy of the revision with all changes highlighted.

RANDOMIZED CLINICAL TRIALS

Effective January 2004, manuscripts reporting a randomized clinical trial should follow the CONSORT guidelines as published in the *Annals of Internal Medicine* (Ann Int Med 134:657-662, 2001). Click [here](#) to download the checklist. This completed checklist file should be uploaded as Supplemental Material.

The *Journal* encourages authors to register their clinical trials in a public trials registry, and we ask authors of manuscripts describing such studies to submit the name of the registry and the study registration number prior to publication. The International Committee of Medical Journal Editors plans to consider clinical trials for publication only if they have been registered (see *N Engl J Med* 2004;351:1250-1 - <http://content.nejm.org/cgi/content/full/351/12/1250>). The following registries meet these requirements: <http://prsinfo.clinicaltrials.gov> and <http://controlled-trials.com/isrctn/submission/>.

GENE DATA

Prior to submission, the *Journal* asks that novel gene sequences be deposited in a public database (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/submit.html>, EMBL, <http://www.ebi.ac.uk/embl/Submission/index.html>, or DDBJ <http://www.ddbj.nig.ac.jp/sub-e.html>), and the accession number provided to the JDR. Manuscript submissions including microarray data should (a) include the information recommended by the MIAME <http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html> guidelines in their submission, and/or (b) identify the submission details for the experimental details to one of the publicly available databases (ArrayExpress <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/> or GEO <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

MANUSCRIPT COMPONENTS

The components of a manuscript should be: 1) title page, 2) abstract, 3) introduction, 4) materials and methods, 5) results, 6) discussion, 7) acknowledgments, 8) references, 9) tables, and 10) figure legends. The complete manuscript should be arranged in that order. Number all pages consecutively in the top right-hand corner, including the title page. Label figures clearly. Each figure label must indicate the number corresponding to the citation in the text, an arrow indicating the top, and contributors' abbreviated names.

1) Title Page (page 1)

Type in bold type with only the first letters of the main words capitalized. The title should be brief (not to exceed 60 characters) and illustrative of the key finding. Also type the contributors' initials and last names in upper- and lower-case letters. Use superscript numbers to relate contributors to different departments or

institutions, or to indicate a change in address. For the corresponding author who will receive reprint requests, provide the full postal (including ZIP or Postal Code) and e-mail addresses, telephone and FAX numbers, as available. If the corresponding author is not the first author, indicate by a number superscript, and use the phrase "corresponding author", and that individual's e-mail address. The following information must be included on the cover page: 1) a short title (running head) of up to 45 characters; 2) three to five key words; 3) the number of words in the abstract; 4) the number of words in the abstract and the text (excluding tables, figure legends, acknowledgments, and cited references); 5) the number of tables and figures; and 6) the number of cited references. If applicable, include source footnotes on page 1 to indicate prior preliminary publication. For example, state that the work was "Based on a thesis submitted to the graduate faculty, Azimuth University, in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree" or that a preliminary report was presented at, or published in... Report all sources of funding in a later section, "Acknowledgments".

2) Abstract (page 2)

A self-standing summary of the text, this section should not exceed one typed page (about 150 words). Concisely describe the (i) background and rationale, (ii) hypothesis or study objective, (iii) design and key methods, (iv) essential results, and (v) conclusions. Avoid abbreviations. The abstract will be re-published separately by information retrieval services.

3) Introduction (page 3)

Briefly and clearly describe the background and rationale for the stated hypothesis to be tested or objective to be studied. Sufficient detail must be provided to permit the interdisciplinary reader to evaluate the results without review of earlier publications. Describe and cite only the most relevant earlier studies; avoid presentation of an exhaustive review of the field. Do not include a summary of the results presented in the manuscript.

4) Materials & Methods

To provide sufficient technical information so that the experiments can be repeated, the (i) experimental or study design, (ii) specific procedures, and (iii) type of statistical analysis must be described clearly and carefully. Use section subheadings in a logical order to title each category or method. Previously published methods should be named (e.g., "ultrasonic treatment" rather than mention of the cited contributors' names) and cited. New methods must be described completely. Present the data that validate the new method. A method used for only part of one experiment may be described briefly in the "Results" section, table footnote, or figure legend. Present descriptive information about large numbers of experimental reagents, microbes, test materials, primer sequences, in tabular form with a brief explanation in the text. Proprietary names and sources of supply of all commercial products must be given in parentheses in the text (name and model of product, company, city, and state or country). Report generic names and terms wherever possible. For protocols involving the use of human subjects or specimens, indicate succinctly that subjects' rights have been protected by an appropriate institutional review board and informed consent was granted. When laboratory animals are used, indicate the level of institutional review and assurance that the protocol ensures humane practices.

5) Results

This section serves only to introduce data in the (i) text, (ii) tables, and (iii) figures and to call attention to their significant parts. Report results concisely, using tables and figures to present important differences or similarities that cannot otherwise be presented or summarized in the text. The rationale and design of experiments should be made clear in the previous sections of the manuscript. Reserve subjective comments,

interpretation, or reference to the previous literature for the "DISCUSSION". Number tables and figures in the order in which they are described and cited in the text. All tabular data should identify and report (i) either standard deviation values or standard errors of the means, (ii) the number of replicate determinations or human or animal subjects, and (iii) probability values and name(s) of statistical test(s) for reported differences. Restrict presentation of photo- and electron micrographs to those essential to the results. If essential to the results, color can be published at the discretion of the Editor. (The cost for color in reprints, however, must be borne by the author. For cost estimates, contact the Central Office at 703-548-0066, e-mail publications@iadr.org.)

6) Discussion

Explain and interpret the results with a scientifically critical view of the previously published work in the field. Highlight the advances made by the new data. Indicate the limitations of the findings. State the conclusions of the report, and explain why they are merited by the data. This is the only proper section for subjective comments.

7) Acknowledgments

Recognize individuals who provided assistance to the project. Report all sources of grant and other support for the project or study, including funds received from contributors' institutions and commercial sources, and do not refer to a study being only partially funded by the cited sources. Consultancies and funds paid directly to investigators must also be listed, with statements such as "This investigation was supported in part by USPHS Research Grant DE-0000-00 from the National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892".

8) References (maximum, 35)

This section will list all sources cited in the paper. Arrange the citations in alphabetical order by last name of the first author without numbering. When citing a reference in the text, provide attribution for the subject under discussion. For example, "Cold fusion has been difficult to replicate (Williams and Jones, 1988), but some recent modifications in experimental design (Jones et al., 1989) continue to stimulate new investigation." Avoid "Jones et al. (1989) found..." or "In a recent study, Jones (1990) found...", which creates vague statements because the subject is shifted from "cold fusion" to the names of the cited contributors. Use "et al." (in italics) when the cited work is by three or more contributors. When the cited work is by two contributors, use both surnames separated by "and". When citing multiple references by the same author(s) in the same year, use "a", "b", etc. (e.g., Jones, 1980b). Multiple references should be listed in chronological order of publication, separated by semi-colons. "Unpublished observations" and "personal communications" may be inserted into and cited (in parentheses) in the text with written permission from the correspondents, but are not to be used as references. Abbreviate journal names according to the style used in Index Medicus. Other titles should be formatted with slight modifications of the style used by the US National Library of Medicine in Index Medicus. Examples of reference citation formats are illustrated below. Avoid using abstracts as references. Data from abstracts should be referenced as "personal communication" or "unpublished observations" as appropriate. When citing a Web site, list the authors and title if known, then the URL and the date it was accessed (in parentheses). Include among the references papers accepted but not yet published; designate the journal and add "(in press)". Information from manuscripts submitted but not yet accepted should be cited in the text as "unpublished observations" (in parentheses). The references must be verified by the author(s) against the

original documents and checked for correspondence between references cited in the text and listed in the "References" section.

Examples of correct forms of references are listed below. They are single-spaced here for illustration but should be double-spaced in the manuscript.

ARTICLES IN JOURNALS

1. Standard journal article - (List all authors, but if the number exceeds six, give six authors' names followed by *et al.*) West DJ, Snaveley DB, Zajac BA, Brown GW, Babb CJ (1990). Development and persistence of antibody in a high-risk institutionalized population given plasma-derived hepatitis B vaccine. *Vaccine* 8:111-114.
2. Organization as author - The Royal Marsden Hospital Bone-Marrow Transplantation Team (1977). Failure of syngeneic bone-marrow graft without preconditioning in post-hepatitis marrow aplasia. *Lancet* 2:742-744.
3. No author given Coffee drinking and cancer of the pancreas (editorial) (1981). *Br Med J* 283:628.
4. Article in a foreign language - Massone L, Borghi S, Pestarino A, Picini R, Gambini C (1987). Localisations palmaires purpuriques de la dermatite herpétiforme. *Ann Dermatol Venereol* 114:1545-1547.
5. Volume with supplement - Magni F, Rossoni G, Berti F (1988). BN-52021 protects guinea pig from heart anaphylaxis. *Pharmacol Res Commun* 20(Suppl 5):75-78.
6. Issue with supplement - Gardos G, Cole JO, Haskell D, Marby D, Paine SS, Moore P (1988). The natural history of tardive dyskinesia. *J Clin Psychopharmacol* 8(4 Suppl):31S-37S.
7. Volume with part - Hanly C (1988). Metaphysics and innateness: a psychoanalytic perspective. *Int J Psychoanal* 69(Pt 3):389-399.
8. Issue with part - Edwards L, Meyskens F, Levine N (1989). Effect of oral isotretinoin on dysplastic nevi. *J Am Acad Dermatol* 20(2 Pt 1):257-260.
9. Issue with no volume - Baumeister AA (1978). Origins and control of stereotyped movements. *Monogr Am Assoc Ment Defic* (3):353-384.
10. No issue or volume - Danoek K (1982). Skiing in and through the history of medicine. *Nord Medicinhist Arsb*:86-100.
11. Pagination in Roman numerals - Ronne Y (1989). Ansvarsfall. Blodtransfusion till fel patient. *Vardfacket* 13:XXVI-XXVII.
12. Type of article indicated as needed - Spargo PM, Manners JM (1989). DDAVP and open heart surgery (letter). *Anaesthesia* 44:363-364. Fuhrman SA, Joiner KA (1987). Binding of the third component of complement C3 by *Toxoplasma gondii* (abstract). *Clin Res* 35:475A.
13. Article containing retraction - Shishido A (1980). Retraction notice: Effect of platinum compounds on murine lymphocyte mitogenesis (Retraction of Alsabti EA, Ghalib ON, Salem MH. In: *Jpn J Med Sci Biol* 1979; 32:53-65). *Jpn J Med Sci Biol* 33:235-237.
14. Article retracted - Alsabti EA, Ghalib ON, Salem MH (1979). Effect of platinum compounds on murine lymphocyte mitogenesis (Retracted by Shishido A. In: *Jpn J Med Sci Biol* 33:235-237, 1980). *Jpn J Med Sci Biol* 32:53-65.
15. Article containing comment - Piccoli A, Bossatti A (1989). Early steroid therapy in IgA neuropathy: still an open question (comment). *Nephron* 51:289-291. Comment on: *Nephron* 51:289-291, 1989.

16. Article commented on - Kobayashi Y, Fujii K, Hiki Y, Tateno S, Kurokawa A, Kamiyama M (1988). Steroid therapy in IgA nephropathy: a retrospective study in heavy proteinuric cases (see comments). *Nephron* 48:12-17. Comment in: *Nephron* 51:289-291, 1989.

17. Article with published erratum - Schofield A (1988). The CAGE questionnaire and psychological health (published *erratum* appears in *Br J Addict* 84:701, 1989). *Br J Addict* 83:761-764.

BOOKS AND OTHER MONOGRAPHS

18. Authored - Colson JH, Armour WJ (1986). Sports injuries and their treatment. 2nd rev. ed. London: Butterworth Heinemann.

19. Editor(s), compiler as author - Diener HC, Wilkinson M, editors (1988). Drug-induced headache. New York: Springer-Verlag.

20. Organization as author and publisher - Virginia Law Foundation (1987). The medical and legal implications of AIDS. Charlottesville, VA: The Foundation.

21. Chapters in a book - Weinstein L, Swartz MN (1974). Pathologic properties of invading microorganisms. In: Pathologic physiology: mechanisms of disease. Sodeman WA Jr, Sodeman WA, editors. Philadelphia: Saunders, pp. 457-472.

22. Conference Proceedings - Vivian VL, editor (1985). Child abuse and neglect: a medical community response. Proceedings of the First AMA National Conference on Child Abuse and Neglect, Mar 30-31, 1984, Chicago. Chicago, IL: American Medical Association.

23. Conference Paper - Harley NH (1985). Comparing radon daughter dosimetric and risk models. In: Indoor air and human health. Proceedings of the Seventh Life Sciences Symposium, Oct 29-31, 1984, Knoxville, TN. Gammage RB, Kaye SV, editors. Chelsea, MI: Lewis Publishers, pp. 69-78.

24. Scientific and technical report - Akutsu T (1974). Total heart replacement device. Apr. Report No.: NIH-NHLI-69-2185-4. Bethesda, MD: National Heart and Lung Institute of the National Institutes of Health.

25. Dissertation - Youssef NM (1988). School adjustment of children with congenital heart disease (dissertation). Pittsburgh, PA: Univ. of Pittsburgh.

26. Patent - Harred JF, Knight AR, McIntyre JS, inventors (1972). Dow Chemical Company, assignee. Epoxidation process. US patent 3,654,317. Apr 4.

OTHER PUBLISHED MATERIAL

27. Newspaper article - Rensberger B, Specter B (1989). CFCs may be destroyed by natural process. *The Washington Post* Aug 7, Sect. A2, col. 5.

28. Audiovisual - AIDS epidemic: the physician's role (videorecording) (1987). Cleveland, OH: Academy of Medicine of Cleveland.

29. Computer file - Renal system (computer program) (1988). MS-DOS version. Edwardsville, KS: Medi-Sim.

30. Legal material - Toxic Substances Control Act: Hearing on S. 776 Before the Subcomm. on the Environment of the Senate Comm. on Commerce. 94th Cong., 1st Sess. 343 (1975).

31. Map - Scotland (topographic map) (1981). Washington: National Geographic Society .

32. Book of the Bible - Ruth 3:1-18. The Holy Bible. Authorized King James version (1972 ed.). New York: Oxford Univ. Press.

33. Dictionary and similar references- Ectasia. Dorland's illustrated medical dictionary. 27th ed. (1988). Philadelphia: Saunders, p. 527.

34. Classical material - The Winter's Tale: act 5, scene 1, lines 13-16. The complete works of William Shakespeare (1973). London: Rex.

UNPUBLISHED MATERIAL

35. In press - Lillywhite HB, Donald JA (1993). Pulmonary blood flow regulation in an aquatic snake. Science (in press).

9) Tables and 10) Figures (maximum, four total)

9) Tables

Type one table per page. In the order of mention in the text, number each table consecutively with Arabic numerals in the heading. In the heading, follow the table number with a brief descriptive title, generally highlighting the key result. Design tables to highlight key results and comparisons. Make every effort to make the presentation of data clear, simple, and uncluttered. As column headings, use accurate descriptors instead of symbols, acronyms, and abbreviations. To avoid overlong titles and cumbersome tables, use explanatory footnotes whenever possible. In the table or title, indicate the order of footnotes with superscript a,b,c,d,e,f, ... If needed in footnotes, cite the short form of references in parentheses. In tabular columns and the text, decimals less than unity must have the decimal point preceded by a zero. To ensure that the presentation is clear, report only the number of significant digits appropriate to the sensitivity and discrimination of the measure and the differences to be illustrated. Column headings should be simple and clear so that tables will be understandable without consultation of the text. Generally, column headings identify dependent variables, while independent variables are identified by row descriptors on the left. Tables will usually be printed either 3-1/4 or 7 inches wide.

10) Figures

Figures are illustrative materials, including photomicrographs, radiographs, charts, and graphs. When possible, an electronic copy of the figure should be provided on a diskette with the text of the manuscript. Digitized figures must be certified by the contributors to be an accurate representation of the original data and not electronically edited. Figures must be discussed thoroughly in the text. Black-and-white photographic prints, laser-quality reproductions, and original drawings on opaque white paper are preferred. Color reproductions will be published free at the discretion of the Editor. Authors wishing to pay to publish color figures should contact the Publications Department at the Central Office, at 703-548-0066, e-mail publications@iadr.org. Prices are listed on the Page Charge/Reprint Order Form. An original and two copies of each figure must be submitted. Each set should be placed in a protective folder, one labeled "for printer" and the other two "for review". On the back of each figure, oriented upright, label with contributors' names and figure number (and letter) in sequence corresponding to its mention in the text. Figures will generally be printed column-width, 1-1/2 columns' width, or page-width. Extraneous material should be cropped out to ensure minimal reduction. If crop marks are necessary, do not place them directly on the figure. Mount the figure on a sheet of paper and place the crop marks on the paper. Photomicrographs must include a scale of the form |_____|, clearly labeled with a convenient unit of length, e.g., 50 μ m. Graphs should be labeled briefly and clearly at the abscissa and ordinate, including the units of measure. All figures must be labeled to allow for easy readability and visualization if reduced by 50% or more. If possible, determine the percentage reduction at which the figure will be reproduced (e.g., 3-1/4 or 7 inches wide). Print a copy at that percentage to see how all elements will be affected. Consider that any line or rule thinner than 1/2 point may not reproduce. Patterns used in bar charts can become illegible,

thus rendering useless any keys provided for graphs. Ideally, all figures should be provided at the optimum size for publication. The title and other identification may appear in the legend.

Legends - Legends for all figures, including charts and graphs, must be typed together on a separate page and should be understandable without reference to the text. Include a title highlighting the key result and a key for any symbols or abbreviations used in the figure.

AUTHORITATIVE REFERENCES

The **Random House Dictionary of the English Language** (Unabridged) will be used as the authority for spelling of non-medical terms. Where two plural forms are provided, the American English form will be used. For anatomical nomenclature, **Nomina Anatomica** (5th ed.) and **Dorland's Illustrated Dictionary** will be considered authoritative.

NOMENCLATURE

Authors should refer to the *International System of Units* (SI), D.T. Goldman and R.J. Bell, Eds., NBS Special Publication 330 (1981). This booklet is available from the US Dept. of Commerce, National Institute of Standards and Technology, Washington, DC 20234. Use of correct symbols includes m for milli-, for micro-, and L for liter (as in mL, L, etc.). Express grams as g, hours as hr, seconds as sec, and centrifugal force as g (e.g., 10,000 g). Use nm rather than Angstroms. Concentrations should be expressed as mol/L or mmol/L, etc. Insert leading zeros in all numbers less than 1.0 in the text, tables, and figures.

Numbers of ten and fewer should be written out (e.g., ten subjects), except when indicating inanimate quantities (e.g., 10 mL), and numbers that are greater than ten should appear as digits. Always use digits to express dates, dimensions, degrees, doses, periods of time, percentages, proportions, ratios, sums of money, statistical results, weights, and measures, or to enumerate animals (but not people), culture cells and organisms, organs, and teeth. Leave a space between numbers and their accompanying units (e.g., 10 mg, not 10mg), and around the = and signs.

Micro-organisms should be referred to in accordance with the International Rules of Nomenclature. When applicable, the nomenclature for bacteria presented in Bergey's Manual of Systemic Bacteriology (current edition) will be followed. The first reference to an organism by genus and species must be in full (e.g., *Lactobacillus casei*); subsequent mention may abbreviate genus (*L. casei*). When a common name of a bacterium or group is mentioned, do not italicize (e.g., "some lactobacilli" or "sanguis group streptococci").

Authors of papers containing primary nucleotide sequencing data are expected to deposit this information in an appropriate database (e.g., GenBank/EMBL). Pertinent accession numbers should be provided with the submitted manuscript. Published articles will include a footnote indicating the accession number and database in which the information was deposited. For examples of format not specified here, contributors should consult the Council of Biology Editors Style Manual (current edition) and current issues of the Journal.

The complete names of individual teeth must be given in full in the text of articles (e.g., "permanent upper right first premolar"). In Tables, these names may be abbreviated by Viohl's Two-digit System. As approved by the International Standards Organization, the first digit indicates the quadrant and the second digit the type of tooth within the quadrant. Starting at the upper right side and rotating clockwise, quadrants are assigned the digits 1 to 4 for the permanent and 5 to 8 for the deciduous teeth; within the same quadrant, teeth from the midline backward are assigned the digits 1 to 8 (deciduous teeth, 1 to 5). For example, the permanent lower right first molar is designated '46' and the deciduous upper left canine, '63'.