

*Kelly Regina Micheletti*

**REMODELAÇÃO ÓSSEA COM AS FORÇAS  
CONTÍNUA, CONTÍNUA INTERROMPIDA E  
INTERMITENTE: MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA  
INDUZIDA EM RATOS**

*Araçatuba – SP  
2015*

*KELLY REGINA MICHELETTI*

**REMODELAÇÃO ÓSSEA COM AS FORÇAS  
CONTÍNUA, CONTÍNUA INTERROMPIDA E  
INTERMITENTE: MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA  
INDUZIDA EM RATOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração Ortodontia.

**Orientador:** Prof. Dr. Osmar Aparecido Cuoghi

**Co-orientadora:** Prof. Dra. Roberta Okamoto

*Araçatuba – SP*

*2015*

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Micheletti, Kelly Regina.

M623r Remodelação óssea com as forças contínua, contínua interrompida e intermitente : movimentação dentária induzida em ratos / Kelly Regina Micheletti. - Araçatuba, 2015  
98 f. : il ; tab. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Orientador: Prof. Osmar Aparecido Cuoghi  
Coorientadora: Profa. Roberta Okamoto

1. Movimentação dentária 2. Ratos 3. Osso e ossos I. T.

Black D4

CDD 617.643

## *KELLY REGINA MICHELETTI*

30-05-1985	Nascimento – São João do Caiuá
2005-2009	Curso de Odontologia, na Universidade Estadual de Maringá - UEM
2010-2011	Curso de Pós-Graduação, em nível de Mestrado em Odontologia Integrada, Universidade Estadual de Maringá - UEM
2011-2013	Curso de Especialização em Ortodontia e Ortopedia Facial, na Universidade Estadual de Maringá - UEM
2013-2015	Atuação na área de Ortodontia e Ortopedia Facial, em clínica particular, na cidade de Londrina - PR
2012-2015	Curso de Pós-Graduação, em nível de Doutorado em Ortodontia, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista - UNESP

## Associações

- Associação Brasileira de Odontologia
- Associação Brasileira de Ortodontia–  
Ortopedia Facial
- World Federation of Orthodontists

# DEDICATÓRIA

## *A Deus*

*Em quem sempre confiei e sempre estive ao meu lado e não me deixou perder a fé entre as sombras do mundo. Ensinou-me que mesmo com os pés sangrando eu deveria seguir em frente. Crer, trabalhar, esforçar-me no bem e esperar com paciência. Ensinou-me que tudo passa e tudo se renova na terra, mas o que vem do céu permanece. Elevei meu olhar e caminhei. Lutei, lutarei e sempre Te servirei. A tempestade que ontem me amedrontou o coração e me atormentou o ideal, não me derrubará no amanhã se eu sempre estiver em Ti.*

*Ao meu marido Gustavo Cerqueira*

*Que em todos os momentos me apoiou, me deu forças e coragem para continuar nessa caminhada. Mais do que marido, um grande amigo que me trouxe até esse instante onde eu vivo feliz. Sem sua companhia eu ficaria a entristecer. Ter sua companhia é o mesmo que estar vivendo com a certeza de ouvir palavras certas nos momentos mais difíceis. Amo-te e sempre te amarei. Que Deus te abençoe.*

*Aos Meus Pais Nivaldo e Lucilena Micheletti*

*Foi por vocês que cheguei até aqui e é por vocês que seguirei em frente. A vocês, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, não bastaria um obrigado. A vocês, que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que os trilhássemos sem medo e cheios de esperanças, não bastaria um muito obrigado. A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus. Pela longa espera e compreensão durante minhas longas viagens, não bastaria um muitíssimo obrigado. A vocês, pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer, que não tenho palavras para agradecer tudo isso. Mas é o que me acontece agora, quando procuro arduamente uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar. Uma emoção que jamais seria traduzida por palavras. Amo vocês!*



## *AGRADECIMENTOS*

*Ao Prof. Dr. Osmar Aparecido Cuoghi, por compartilhar seu conhecimento e experiência, contribuindo para o meu aprimoramento científico e intelectual. Agradeço pela oportunidade, confiança e por todos os momentos em que estivemos juntos.*

*A Prof. Dra. Roberta Okamoto, pela brilhante co-orientação. Você foi um anjo que Deus colocou no meu caminho para me dar força, ensinamentos e lições de vida durante minha caminhada por esse curso.*

*Ao Prof. Dr. Adilson Luiz Ramos, pelo seu exemplo pessoal, profissional e dedicação ao ensino da Ortodontia. Sua postura, orientação e seus ensinamentos influenciaram diretamente em minha escolha pela carreira docente. Você foi o pegureiro das minhas ações e das minhas determinações. Professores nunca morrem. Vivem em sua memória para sempre. Todo o meu respeito e admiração.*

*Aos Professores da Disciplina de Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Prof. Dr. Francisco Antônio Bertoz, Prof. Dr. Marcos Rogério de Mendonça, Prof. Dr. Osmar Aparecido Cuoghi, Prof. Dr. André Pinheiro de Magalhães Bertoz e Prof. Dr. Renato Bigliuzzi pelos preciosos ensinamentos transmitidos neste curso, contribuindo para meu enriquecimento profissional.*

*Aos meus parceiros fiéis de doutorado. A amiga-irmã Yésselin Zamalloa, pelo seu companheirismo, empenho e auxílio na idealização e realização desta pesquisa. Obrigado pelas experiências e momentos vividos diante de uma amizade sincera. A amiga Ana Carolina Verry, exemplo de honestidade e força. Ao amigo Éverton Lelis, amigo de todas as horas, metódico e dedicado. Ao amigo Renato Bigliuzzi, exemplo de inteligência, esforço, dedicação profissional e humildade. Ao amigo Laércio Dias, exemplo de paciência e calma diante das diversas situações vividas.*

*Aos meus grandes amigos, Tiago e Anne Aita, Vivian Kitayama, Marcos Endo, Gisette e Edson Provenzano, Juliana Silva, Jairo Rasteli, Talita e Fábio Andrian, Gustavo Zanna, Carolina Danieletto, Rodrigo Vidi, Carolina Tognon, Ariane e Andreo*

*Parra, Vanessa e Valmir Cardoso, Salam Obeid, Nayara Candotti, Paula e Paulo Müller, Marta e Roberto Falcon, Patrícia e Antônio Campanholi, Paula e Cleomárcio Barbosa, Camila e Fábio Zanluchi, Ana Paula Bruno, Tiago Zanluchi, Patrícia e Gistavo Baldissera, Siomar e Fausto Buba, Juliana Haddad, Rafael Galindo, Fábio Suano, Daniele e Preto Freitas.*

*À minha família, pelo constante apoio, Mãe, Pai, Clayton e Amanda Micheletti. Aos meus avós Joana e Silvestre (in memorian) Tarniovi, José e Laura Micheletti. Aos tios Inês, Carlos Roberto, Pedro, Dora, Neucides, Norberto, Nicomedes, Neuza, seus cônjuges e filhos e a todos os outros familiares que me ampararam e torceram por mim, meu muito obrigado. Da mesma forma, aos familiares herdados pelo matrimônio, Gilmar, Rosilene, Gabriel, Ricardo, Maria de Lurdes, Vânia, Roselis, Rosemeire, Roberto, seus cônjuges e filhos. Aos avós herdados Alvarinda e Oliveira (in memorian), Júlia e Alfredo (in memorian).*

*Aos colegas de pós-graduação Márcio Salazar, Juliana Kina, Aubrey Fabre, Lorraine Faria, Franciele Topolski, Camila Ferlin, Priscila Cunha, Luciana Artioli, pelas experiências e trabalhos compartilhados, pelo convívio e amizade que fizemos.*

*Aos Professores do Curso de Especialização em Ortodontia da Universidade Estadual de Maringá, Prof. Dr. Adilson Luiz Ramos, Prof. Dr. Hélio Hissashi Terada, Prof. Dr. Laurindo Zanco Furquim e Prof. Dra. Roseli Suguino pelo incentivo e oportunidade para realização deste curso.*

*Aos funcionários da Disciplina de Ortodontia, Ilídio Teodoro Filho, por sua amizade e incansável prontidão em atender a todos. À Maria Bertolina Mesquita Oliveira e Luíz, pelo auxílio no decorrer do curso.*

*Aos demais funcionários, Eliseide, Joilson e funcionários do laboratório do departamento de Cirurgia.*

*Às alunas de Iniciação Científica, orientadas da professora Roberta, sem vocês não conseguiríamos processar todas as lâminas de imunologia.*

*Aos funcionários da secretaria de pós-graduação, Valéria, Cristiane e Lilian, pela atenção e eficiência com que atendem a todos.*

*À minha funcionária Rosângela, ao Departamento de Odontologia da UEM, ao Departamento de Histologia da UEM, aos meus colegas de profissão e a todos da Oralmed, que de alguma forma me ajudaram a realizar esse sonho.*

*À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.*

*A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba que, de muitas formas, contribuíram para a minha formação e a realização deste trabalho.*

*A todos os funcionários do Centro de Assistência Odontológica à Pessoa com Deficiência (CAOE), por todo aprendizado, ensinamento e carinho.*

*À Renovação Carismática da Paróquia Nossa Senhora Auxiliadora, pelas orações e ensinamentos da palavra de Deus, a mim e à meu marido, que nos fazem pessoas melhores a cada dia.*

*Que Deus abençoe a todos estes que me ajudaram a realizar este curso e esta pesquisa.*

## *EPÍGRAFE*

*“O primeiro em pedir desculpas, é o mais valente. O primeiro em perdoar, é o mais forte. O primeiro em esquecer, é o mais feliz.”*

*Papa Francisco*

Micheletti KR. Remodelação óssea com as forças contínua, contínua interrompida e intermitente: movimentação dentária induzida em ratos [Tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2015.

## 1.1 RESUMO GERAL

**Introdução:** A aplicação de diferentes tipos de força pode provocar comportamentos distintos no osso alveolar. **Proposição:** avaliar se o lado contra-lateral (CL) a movimentação dentária induzida pode ser usado como grupo controle e a variação da quantidade de tecido ósseo frente a aplicação dos diferentes tipos de força em molares murinos. **Métodos:** Utilizou-se 60 ratos machos (Wistar-Rattus norvegicus), com aproximadamente 90 dias de idade e peso de 300g, divididos em 4 grupos de acordo com o tipo de força; Grupos controle (C), força contínua (FC), força contínua interrompida (FCI) e força intermitente (FI). As forças foram aplicadas nos períodos de 5, 7 e 9 dias (n=6) e analisou-se a quantidade de tecido ósseo alveolar. Os dados foram tabulados e realizou-se o teste estatístico com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). **Resultados:** houve diferença estatisticamente significativa nos percentuais de colágeno entre os grupos C ( $80\% \pm 0,01$ ) e FC ( $62,2\% \pm 0,15$ ) e que o grupo CL foi estatisticamente igual aos demais grupos. A imunomarcagem de OPG, o grupo C e o CL se comportaram de forma semelhante. A RANKL, na face mesial do grupo CL se comportou de forma semelhante ao FC e sua face distal diferiu dos demais grupos. A face distal do grupo C obteve score semelhante a face distal do grupo FC. A análise do tecido ósseo inter-grupos mostrou que aos 5 dias de MDI houve diminuição significativa dos percentuais de osso dos grupos FC ( $62\% \pm 0,14$ ), FCI ( $55\% \pm 0,07$ ) e FI ( $54\% \pm 0,05$ ) em relação ao grupo C ( $80\% \pm 0,01$ ) ( $p < 0,05$ ). Aos 7 dias de movimentação, essa diminuição ainda era significativa nos grupos FC ( $64\% \pm 0,1$ ) e o FI ( $38\% \pm 0,1$ ) quando comparados ao grupo C ( $80\% \pm 0,01$ ) e também houve diferença estatisticamente significativa entre o FC ( $64\% \pm 0,1$ ) e FI ( $38\% \pm 0,1$ ) ( $p < 0,05$ ). Aos 9 dias de movimentação, essa diminuição foi significativa entre os grupos FC ( $68\% \pm 0,03$ ) e FCI ( $51\% \pm 0,13$ ), e C ( $80\% \pm 0,01$ ) e FCI ( $51\% \pm 0,13$ ). A análise do tecido ósseo intra-grupos revelou uma manutenção nos níveis de osso no grupo FC. Uma perda de osso significativa no grupo FCI sétimo ao nono dia ( $p < 0,05$ ) e um ganho seguido de uma perda óssea no grupo FI ( $p < 0,05$ ). A imunomarcagem confirmou todos esses resultados. **Conclusões:** A MDI aplicada em um dos lados da maxila interfere nas reações do tecido ósseo do lado contra-lateral à movimentação. A FC não variou sua massa óssea significativamente durante os períodos experimentais e se igualou estatisticamente ao GC no nono dia. A FI teve sua massa óssea diminuída significativamente ao sétimo dia devido a reativação do dispositivo ortodôntico e provável interrupção do processo de remodelação óssea, evento também observado na FCI após os sete dias de movimentação.

**Palavras-chave:** Movimentação dentária. Ratos. Osso.

Micheletti KR. Bone remodeling with continuous, interrupted continuous and intermittent forces: tooth movement in rats [Thesis]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2015.

## 1.2 ABSTRACT GERAL

**Introduction:** There are few researches about the behavior of the alveolar bone in relationship of three different types of forces. **Objective:** To evaluate if the bone on the contralateral side to orthodontic tooth movement can be used as the control group (CL) and the amount of bone tissue during the application of different types of force in rats molars. **Methods:** 60 male rats (*Rattus norvegicus* Wistar), with approximately 90 days of age and weight of 300g, divided into 4 groups according to the type of force: control group (C), continuous force (CF), intermittent continuous force (ICF) and interrupted force (IF); The groups were distributed in periods of 5, 7 and 9 days ( $n = 6$ ). Were analyzed the amount of bone tissue of right upper first molar. The evaluation were conducted with Anova and Tukey's tests a significance level of 5% ( $p < 0.05$ ). **Results:** The collagen analysis demonstrated a statistically significant difference between the C group ( $80 \pm 0.01\%$ ) and CF ( $62.2 \pm 0.15\%$ ), whereas no significant differences were found between the CL group and the other groups. Immunolabeling for OPG was similar in the C and CL groups. RANKL on the mesial face was similar in the CL and CF group. However, significant differences were found between the CL group and the other groups on the distal face, whereas no significant difference on the distal face was found between the C and CF group. The intergroup bone tissue analysis showed that the five days of induced tooth movement (ITM) was no significant decrease in bone percentage of CF groups ( $62\% \pm 0.14$ ), ICF ( $55\% \pm 0.07$ ) and IF ( $54\% \pm 0.05$ ) in the C group ( $80\% \pm 0.01$ ) ( $p < 0.05$ ). At 7 days of ITM, this reduction was still significant in the CF group ( $64\% \pm 0.1$ ) and IF ( $38\% \pm 0.1$ ) compared to C group ( $80\% \pm 0.01$ ) and there was also difference statistically significant between CF ( $64 \pm 0.1\%$ ) and IF ( $38\% \pm 0.1$ ) ( $p < 0.05$ ). After 9 days of ITM, this decrease was significant between the CF group ( $68\% \pm 0.03$ ) and ICF ( $51\% \pm 0.13$ ), C ( $80\% \pm 0.01$ ) and ICF ( $51\% \pm 0.13$ ). The intra-group analysis showed a bone maintenance in bone levels in the CF group. A significant bone loss in ICF seventh to ninth day group ( $p < 0.05$ ) and a gain followed by a bone loss in IF group ( $p < 0.05$ ). The immunolabelling confirmed all these results. **Conclusions:** OTM administered to one side of the maxilla affects bone tissue reactions on the contralateral side. The CF did not change significantly their bone mass during trial periods and statistically matched the CG on the ninth day. The IF had a decreased bone mass significantly the seventh day due to reactivation of orthodontic appliance and probable interruption of the process of bone remodeling, event also observed in the FCI after the seven-day drive.

**Key Words:** Tooth movement. Rats. Bone.

## *Lista de Figuras*

### **Capítulo 1**

- Fig. 1      Moda dos imunomarcadores OPG e RANKL nos grupos controle, Movimentado e contra lateral.      46

### **Capítulo 2**

- Fig. 1      Grupos FC (Figura 1A), FCI (Figura 1B) e FI (Figura 1C) e suas subdivisões de acordo com o período total de movimentação, 5, 7 e 9 dias.      72

- Fig. 2      Procedimento de indução da anquilose do incisivo superior direito: (A e B) Exodontia; (C) Alvéolo; (D) Fluoreto de Sódio Fosfato Acidulado 2% usado para lavar o dente extraído; (E) Corte da papila dentária e órgão do esmalte; (F) Irrigação com soro; (G) Instrumentação do canal radicular; (H) Secagem do conduto radicular; (I) Preenchimento do canal radicular com pasta de hidróxido de cálcio e propileno glicol; (J) Aplicação de Penicilina G Benzatínica; (K) Reimplante dentário.      73

- Fig. 3      Determinação da anquilose do incisivo superior direito: (A e B) canaleta fabricada na resina colocada no incisivo direito e esquerdo; (C e D) comprovação da erupção ativa do incisivo esquerdo e ausência dela no incisivo direito; (E) Lâmina histológica comprovando a anquilose do incisivo direito (setas amarelas).      74

- Fig. 4      Instalação do dispositivo para MDI: (A) Posicionamento dito-vestibular do fio de amarrilho. (B) Fio de amarrilho inserido vestibulo-lingual abaixo do ponto de contato entre o primeiro e segundo molar; (C) Molar envolvido ao fio; (D) Inserção da mola de NiTi ancorada ao incisivo direito.      75

- Fig. 5      Estabelecimento das diretrizes para as análises histométricas: (A) Osso alveolar situado a mesial e a distal da raiz mesiovestibular do primeiro molar superior direito onde a análise Imunoistoquímica foi realizada; (B) Crista óssea alveolar situada entre as raízes médias e distais do primeiro molar superior direito onde a análise com HE foi realizada.      76

- Fig. 6 Técnica para delimitar a área ocupada por tecido ósseo na maxila (aumento de 10X); (A) Demarcação do osso alveolar na área interradicular tomando-se como ponto de referência o centro pulpar de cada uma das 4 raízes (distais e médias) do primeiro molar; (B) Extração do osso alveolar da região delimitada na figura 1B; (C) Toda a área rosa representa tecido ósseo corado de vermelho pelo programa Image Pro-plus®; (D) A área em branco corresponde a área ocupada por osso totalmente diferenciada para posterior quantificação ( $\mu\text{m}^2$ ); (E) Área total da região intraóssea corada em vermelho; (F) A área em branco corresponde a área total a ser quantificada ( $\mu\text{m}^2$ ). 77
- Fig. 7 Análise da porcentagem de tecido ósseo localizado entre as raízes médias e distais do primeiro molar nos grupos Controle (C), força contínua (FC), força contínua interrompida (FCI) e força intermitente (FI) nos períodos de movimentação de 5, 7 e 9 dias: letras diferentes indicam diferença estaticamente significativa ( $p < 0,05$ ). 78
- Fig. 8 Fotomicrografia do tecido ósseo entre as raízes médias palatina dos grupos Controle (C), Força Contínua (FC), Força Contínua Interrompida (FCI) e Força Intermitente (FI) nos períodos experimentais de 5, 7 e 9 dias (Aumento original 10X) e coloração com Hematoxilina & Eosina). 79
- Fig. 9 Fotomicrografia do tecido ósseo entre as raízes médias palatina dos grupos Controle, Força Contínua (FC), Força Contínua Interrompida (FCI) e Força Intermitente (FI) nos períodos experimentais de 5, 7 e 9 dias - aumento original 10X e coloração com Hematoxilina & Eosina. 80
- Fig.10 Moda dos imunomarcadores OPG e RANKL no osso alveolar mesial e distal da raiz mesiovestibular do primeiro molar superior direito aos 5, 7 e 9 dias de MDI no grupo força contínua e grupo controle. 81
- Fig. 11 Moda dos imunomarcadores OPG e RANKL no osso alveolar mesial e distal da raiz mesiovestibular do primeiro molar superior direito aos 5, 7 e 9 dias de MDI no grupo força contínua interrompida e grupo controle. 82
- Fig. 12 Moda dos imunomarcadores OPG e RANKL no osso



alveolar mesial e distal da raiz mesiovestibular do primeiro molar superior direito aos 5, 7 e 9 dias de MDI no grupo força intermitente e grupo controle.

## *Lista de Tabela*

### **Capítulo 1**

Tab. I	Média (X) e desvio padrão (sd) do percentual da área ocupada por colágeno nos grupos Controle, Movimentado e Contra-lateral: Anova e pós-teste Tukey ( $p < 0,05$ ).	48
Tab. II	Porcentagem da frequência dos scores (0, 1, 2, 3) de OPG nos grupos Controle, Movimentado e contra-lateral das faces distal e mesial da raiz mesiovestibular do primeiro molar superior.	49
Tab. III	Porcentagem da frequência dos scores (0, 1, 2, 3) de OPG nos grupos Controle, Movimentado e contra-lateral das faces distal e mesial da raiz mesiovestibular do primeiro molar superior	50

### **Capítulo 2**

Tab. I	Análise inter-grupos da média (X) e desvio padrão (SD) do percentual da área ocupada por matriz orgânica de tecido ósseo nos Grupos Controle (C), força contínua (FC), força contínua interrompida (FCI) e força intermitente (FI): Anova e pós-teste Tukey ( $p < 0,05$ ).	85
Tab. II	Análise intra-grupos da média (X) e desvio padrão (SD) do percentual da área ocupada por matriz orgânica de tecido ósseo nos Grupos Controle (C), força contínua (FC), força contínua interrompida (FCI) e força intermitente (FI): Anova e pós-teste Tukey ( $p < 0,05$ ).	86

## *Lista de Abreviações*

ANOVA	=	Análise de Variância
DP	=	Raiz distopalatina
DV	=	Raiz distovestibular
dp	=	Desvio padrão
FC	=	Força contínua
FCI	=	Força contínua Interrompida
FI	=	Força intermitente
GC	=	Grupo Controle
Cn	=	Centi-Newton – Unidade de medida da força
LP	=	Ligamento periodontal
MDI	=	Movimentação Dentária Induzida
MP	=	Raiz média palatina
MV	=	Raiz média vestibular
$\mu\text{m}^2$	=	Micrometros quadrados
NiTi	=	Liga de Niquel-titânio

## *Sumário*

1 RESUMO	3
1.1 RESUMO GERAL	11
1.2 ABSTRACT GERAL	12
2 CONTEXTUALIZAÇÃO	20
<b>3 CAPÍTULO 1</b>	<b>27</b>
3.1 RESUMO	28
3.2 ABSTRACT	29
3.3 INTRODUÇÃO	30
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.4.1 Animais	32
3.4.2 Métodos	32
3.4.2.1 Instalação e ativação dos dispositivos para MDI	33
3.4.2.2 Eutanásia e processamento histotécnico	33
3.4.2.3 Análise histomorfológica da área ocupada por colágeno	34
3.4.2.4 Análise Histoquímica	35
3.4.3 Análise Estatística	35
3.5 RESULTADOS	36
3.6 DISCUSSÃO	37
3.7 REFERÊNCIAS	41
ANEXOS	51
<b>4 CAPÍTULO 2</b>	
4.1 RESUMO	55
4.2 ABSTRACT	56
4.3 INTRODUÇÃO	57
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	58
4.4.1 Animais	58

4.4.2 Métodos	60
4.4.2.1 Instalação e ativação dos dispositivos para MDI	60
4.4.2.2 Eutanásia e processamento histotécnico	60
4.4.2.3 Estabelecimento das diretrizes para as análises histométricas	61
4.4.2.4 Análise histométrica da área ocupada por tecido ósseo	61
4.4.2.5 Análise Histoquímica	62
4.4.3 Métodos estatísticos	62
4.5 RESULTADOS	63
4.6 DISCUSSÃO	64
4.7 CONCLUSÃO	68
4.8 REFERÊNCIAS	68
ANEXOS	87

## 2 CONTEXTUALIZAÇÃO

As forças são vetores caracterizados por magnitude, direção e duração e a forma adequada de expressar a unidade de força é o newton (N), e não o grama (g).

A força também pode ser classificada segundo a sua magnitude. Em humanos as forças são classificadas segundo a sua magnitude em suaves (aquelas que atingem até 100 cN), moderadas (as situadas entre 100 cN e 400 cN) e intensas (acima de 400 cN).<sup>2</sup> O molar humano é aproximadamente 20 vezes maior do que o molar do rato. As molas helicoidais de 10, 25, 50 e 100 cN usadas em ratos corresponde a 200, 500, 1000 e 2000 cN em um molar humano. 2000cN de força é a força utilizada na expansão rápida de maxila, na qual o parafuso produz 1300-4500 cN em uma única ativação (0,25mm).<sup>3</sup>

Uma determinada força gera no periodonto um estresse no ligamento periodontal (LP) que absorve a força e a distribui na superfície do LP. Essa distribuição dependente de vários fatores, como a magnitude da força, a superfície do osso e a distribuição da força de acordo com o tipo de movimento realizado.<sup>4,5</sup> Dados na literatura sugerem que a força aplicada deve ter um valor ótimo para preservar a vitalidade dos tecidos periodontais e seu valor não deve exceder 20-25 g/cm<sup>2</sup> ou 80 g/cm<sup>2</sup>.<sup>6,7</sup> Porém, não há evidências seguras para a determinação da intensidade de força ideal para a movimentação ortodôntica (Ren *et al.*, 2003). Assim, a amplitude do estresse gerado pelo dispositivo ortodôntico no LP, não a magnitude da força, é o principal parâmetro mecânico de movimentação que regula o deslocamento dentário. Portanto, a movimentação dentária, empregada como método terapêutico, é reconhecida como um fenômeno biológico e não como um evento estritamente físico (Consolaro, 2012).

Uma força ótima deve ser aquela que produz um estímulo mecânico extrínseco que gera uma resposta celular. As células respondem ao estímulo com o objetivo de restaurar o equilíbrio (homeostase), remodelando os tecidos de suporte. Assim, deve-se considerar um estímulo mecânico adequado quando se proporciona o máximo de movimentação dentária com mínimos danos irreversíveis à raiz, ao LP e ao osso alveolar (Proffit, 2000; Ren *et al.*, 2003).

As forças ortodônticas também podem ser classificadas segundo sua duração. Elas podem ser aplicadas de forma *intermitente*, *contínua* (sem interrupções) ou *contínua interrompida*. As forças intermitentes são observadas com a utilização de aparelhos removíveis e proporcionam períodos de repouso e movimentação, permitindo a proliferação celular e respostas teciduais entre os períodos de ativações. O emprego desse tipo de força proporciona menos reabsorções radiculares, porém apresenta menor quantidade de movimentação dentária, haja vista que durante os períodos de repouso ocorrem recidivas (Hayashi *et al.*, 2004).

Com a força contínua o movimento dentário tende a ocorrer mais rapidamente, pois o estresse celular permanece por um longo período. Esse tipo de força ocorre, principalmente, quando se utilizam fios de alta flexibilidade, associados a aparelhos fixos, como os superelásticos.

Com a utilização da força contínua interrompida, observada principalmente nos fios de aço em aparelhos fixos, o estresse permanece por um menor período de tempo, devido à desativação sucessiva, inerente a liga metálica. Embora o movimento dentário seja maior com o emprego de forças contínuas, estudos

demonstram que com esse tipo de força os dentes apresentam mais suscetibilidade a reabsorções radiculares do que os dentes movimentados com forças contínuas interrompidas (Weiland, 2003; Pizzo *et al.*, 2007).

Para mover um dente de forma controlada, uma força deve ser aplicada com magnitude e direção desejadas. Alterar a direção, a magnitude ou o ponto de aplicação da força implica na qualidade do deslocamento. Intuitivamente, o ponto de aplicação da força influencia a qualidade e quantidade do deslocamento dentário. Existe apenas um ponto por meio do qual uma força pode ser aplicada e que movimentará o dente na direção da força sem inclinação ou rotação. Esse ponto é chamado de *centro de resistência* e uma força exercida através dele proporcionará a translação pura do dente. Portanto, para realizar a movimentação dentária, uma força deve ser aplicada na direção adequada, com a magnitude desejada e na posição correta. Alterar a direção, a magnitude ou o ponto de aplicação da força irá afetar a forma do deslocamento dentário.

Na ortodontia clássica, os dentes se movimentam após a aplicação de forças que são intensas logo após a ativação do aparelho e vão se declinando até a próxima ativação. Em décadas passadas, o índice de movimentação dentária pelo tempo passado após a aplicação da força era descrito em 3 fases – a fase inicial, fase retardatária e uma fase pós-retardatário. A fase inicial foi caracterizada pelo rápido movimento imediatamente após a aplicação de força no dente. Após a fase inicial, ocorria um período retardatário, com taxas relativamente baixas de movimentação dentária ou nenhuma movimentação. E a terceira fase da



movimentação dentária, na qual a taxa de movimento diminuía gradualmente ou de repente (Burstone, 1962).

Dois estudos posteriores ao de Burstone (1962) propuseram um novo modelo de índice de movimentação dentária pelo tempo passado após a aplicação da força para a movimentação dentaria (Pilon *et al.*, 1996; van Leeuwen *et al.*, 1999). Esses estudos, realizados em beagles, dividiram a curva de movimentação dentaria em 4 fases:

#### *Fase 1 – Inicial*

Caracterizada pelo início do movimento dentário que ocorre entre 10 e 48 horas após a aplicação da força. Durante essa fase ocorre o deslocamento do dente no espaço do LP, pela flexibilidade óssea e pela extrusão dentária. Também é nessa fase que acontece o processo de recrutamento de células progenitoras de osteoclastos e osteoblastos, o extravasamento e a quimiotaxia de células inflamatórias e a formação de zonas hialinas, principalmente nas áreas de compressão (von Böhl *et al.*, 2004).

#### *Fase 2 – Intermediária ou período de estagnação*

Ocorre logo após a fase inicial e pode se estender até 15 dias. Nessa fase o movimento é mínimo ou nulo, devido às resistências proporcionadas pelas estruturas do LP e do osso alveolar, bem como pelo aparecimento de áreas de hialinização do LP. Essa restrição de movimento permanece até que o tecido de hialinização seja eliminado. Nessa fase, o processo de reabsorção óssea ocorre distante das áreas de maior estresse, ou seja, nos espaços medulares do osso

alveolar e em regiões adjacentes às áreas hialinas. Esse fenômeno de reabsorção é conhecido como *reabsorção a distância* ou *reabsorção indireta*.

#### *Fases 3 e 4 – Aceleração e linear*

Estas fases começam por volta de 30 e 40 dias após a aplicação inicial da força, respectivamente. Nelas ocorre a complementação do deslocamento dentário até a próxima ativação. Os lados de compressão do LP apresentam fibras colágenas sem orientação adequada. As superfícies ósseas próximas ao dente apresentam-se irregulares, indicando reabsorção direta ou frontal. No entanto, os lados de tração mostram claramente a deposição de tecido ósseo.

Assim como em todos os tecidos conjuntivos, os constituintes básicos do osso são uma extensa matriz e diversos tipos celulares que atuam na síntese óssea e contínua remodelação. A matriz óssea é composta por matéria orgânica (sintetizada pelos osteoblastos) reforçada por depósitos inorgânicos de sais de cálcio. As fibras colágenas compreendem cerca de 90% do total de proteínas ósseas que estão orientadas em direções pré-determinadas, conferindo ao osso sua estrutura lamelar. Os outros 10% de matriz orgânica compreendem as proteoglicanas e proteínas de ligação celular (Titorencu *et al.*, 2014).

A análise histológica da área da matriz orgânica do tecido ósseo fornece dados sobre a quantidade de neoformação óssea. Portanto, se um determinado osso apresentar uma grande área de matriz orgânica, significa que também existe nesse osso um equilíbrio na remodelação. Ao contrário, se um osso apresentar pouca quantidade de matriz orgânica, o mesmo estará em processo de reabsorção óssea.

A imunistoquímica pode ser outro método de avaliar a remodelação óssea. Através de imunomarcadores, qualifica-se a atividade celular. O metabolismo ósseo é mediado por processos celulares dos quais liberam proteínas como a OPG e RANKL. Os osteoblastos regulam a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea ao produzirem OPG e RANKL. Possíveis modificações na integração entre as proteínas OPG e RANK levariam a alteração na qualidade do tecido mineralizado formado (Simonet *et al.*, 1997). A RANKL é uma proteína produzida pelos osteoblastos, células do estroma ósseo, e pelos linfócitos T ativados. Ela pode promover a reabsorção óssea ao ligar-se à RANK na superfície de pré-osteoclastos, estimulando sua diferenciação e ativação em osteoclastos. A OPG é uma proteína também produzida por osteoblastos e células do estroma ósseo, capaz de se ligar a RANKL impedindo sua ligação a RANK (Suda *et al.*, 1999). Ligando-se à RANKL, a OPG inibe a maturação dos osteoclastos, contendo assim a osteoclastogênese e o desenvolvimento de linfócitos (Low *et al.*, 2005).

*3 CAPÍTULO 1*

## **O LADO CONTRA-LATERAL AO DENTE COM MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA INDUZIDA NÃO PODE SER USADO COMO GRUPO CONTROLE**

Osmar Aparecido Cuoghi<sup>a</sup>, Kelly Regina Micheletti<sup>b</sup>, Yésselin Margot Miranda-Zamalloa<sup>b</sup>, Roberta Okamoto<sup>c</sup>, Marcos Rogério de Mendonça<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Professor Adjunto do Departamento de Odontologia Infantil e Social, Disciplina de Ortodontia Preventiva, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Univ. Estadual Paulista – UNESP.

<sup>b</sup> Doutoranda pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Univ. Estadual Paulista – UNESP.

<sup>c</sup> Professora Assistente do Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Univ. Estadual Paulista – UNESP.

Palavras-chave: movimentação dentária, grupo controle, ratos, imunoistoquímica, colágeno, técnica histológica.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Kelly Regina Micheletti

Departamento de Odontologia Infantil e Social - Disciplina de Ortodontia Preventiva -  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

Rua José Bonifácio 1193, CEP 16015-050, Araçatuba, SP, Brazil

Tel: 055 (43) 8860-7161

e-mail: kellymicheletti@hotmail.com

Micheletti KR. O lado contra-lateral ao dente com movimentação dentária induzida não pode ser usado como grupo controle [Qualificação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2015.

### 3.1 Resumo

A movimentação dentária induzida (MDI) produz forças de tensão e compressão dentro do ligamento periodontal que são transferidas para o osso alveolar adjacente. Alguns estudos de MDI em ratos utilizam o lado contra-lateral da maxila como grupo controle. Porém, não foi encontrado se a MDI realizada de um lado da maxila de ratos é capaz de modificar a remodelação óssea do lado contra-lateral a ponto de incapacitá-lo de ser usado como controle. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar se o osso do lado contra-lateral à MDI pode ser usado como grupo controle. Foram utilizados 14 animais divididos conforme a aplicação de força nas hemimaxilas: Grupo Controle (GC) (hemi-maxila sem MDI); Grupo movimentado (GM) (hemi-maxila com MDI); e Grupo Contra-lateral (GCL) (hemi-maxila do lado oposto à MDI). O incisivo direito do grupo movimentado foi anquilosado e seu molar direito sofreu MDI com auxílio de mola de níquel-titânio. Após 5 dias da ativação das molas, os animais foram eutanasiados, as hemimaxilas foram dissecadas e passaram por processamento histotécnico. Algumas lâminas foram coradas em HE para análise de colágeno e outras receberam análise histoquímica (OPG e RANKL) para avaliar a remodelação óssea. A análise do colágeno mostrou que houve diferença estatisticamente significativa nos percentuais de colágeno entre os GC ( $80\% \pm 0,01$ ) e GM ( $62,2\% \pm 0,15$ ) e que o GCL foi estatisticamente igual aos demais grupos. A imunomarcagem de OPG, o GC e o GCL se comportaram de forma semelhante. A RANKL, na face mesial do GCL se comportou de forma semelhante ao GM e sua face distal diferiu dos demais grupos. A face distal do GC obteve score semelhante a face distal do GM. Portanto, rejeitamos a hipótese nula e concluímos que a MDI aplicada em um dos lados da maxila interfere nas reações do tecido ósseo do lado contra-lateral à movimentação.

**Palavras-chave:** movimentação dentária, grupo controle, ratos, imunoistoquímica, colágeno, técnica histológica.

Micheletti KR. The contralateral side cannot be used as control group in tooth movement [Qualification]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2015.

### 3.2 ABSTRACT

**Introduction:** Orthodontic tooth movement (OTM) in rats normally used the contralateral side of the maxilla as the control group. However, it is not known whether OTM on one side of the maxilla is able to modify bone remodeling on the contralateral side to the point of making it unviable as the control. Thus, the aim of the present study was to determine whether the bone on the contralateral side to OTM can be used as the control group. **Methods:** Twelve Wistar rats were divided into groups based on the application of force at hemi-maxilla: control group (CG); movement group (MG) and contralateral group (CLG). **Results:** The collagen analysis demonstrated a statistically significant difference between the CG ( $80 \pm 0.01\%$ ) and MG ( $62.2 \pm 0.15\%$ ), whereas no significant differences were found between the CLG and the other groups. Immunolabeling for OPG was similar in the CG and CLG. RANKL on the mesial face was similar in the CLG and MG. However, significant differences were found between the CLG and the other groups on the distal face, whereas no significant difference on the distal face was found between the CG and MG. **Conclusion:** OTM administered to one side of the maxilla affects bone tissue reactions on the contralateral side.

**Key Words:** tooth movement, control group, rats, immunohistochemistry, collagen, histological techniques.

### 3.3 INTRODUÇÃO<sup>1</sup>

A movimentação dentária induzida (MDI) produz forças de tensão e compressão dentro do ligamento periodontal (LP) que posteriormente são transferidas para o osso alveolar adjacente (Tamatsu *et al.*, 1996). Essas forças, por sua vez, iniciam as respostas celulares, resultando em remodelação seletiva do osso alveolar, permitindo a migração dentária. Durante esse processo, o osso é depositado na parede alveolar da região onde as forças de tensão foram aplicadas, e a reabsorção é evidente na região onde atuam as forças de compressão (Ashizawa and Sahara, 1998).

As respostas biológicas à aplicação de força são complexas e para entender os mecanismos da MDI, animais têm sido constantemente usados em estudos experimentais (Pillon *et al.*, 1996; Guajardo *et al.*, 2000; Verna *et al.*, 2004; de Carlos *et al.*, 2006). Dentre os animais utilizados em estudos experimentais de MDI estão os cachorros (van Leeuwen *et al.*, 1999; Guajardo *et al.*, 2000; Deguchi *et al.*, 2008), os coelhos (Kiliç *et al.*, 2010), e predominantemente os ratos (Kawarizadeh *et al.*, 2004; Kogure e Noda, 2009; Drevensek *et al.*, 2009), sendo que este animal é considerado o mais adequado para este tipo de estudo.

Em um levantamento bibliográfico na base de dados dos últimos 10 anos no Pubmed, no qual se utilizou a palavra *tooth movement and rats* na busca, foram encontrados um total de 348 artigos. Destes, 42 utilizavam o lado da maxila não movimentado (contra-lateral) como grupo controle e os demais formaram um grupo controle a parte.

---

<sup>1</sup>O texto foi escrito no formato de artigo, segundo as normas da revista Archives of Oral Biology (Anexo I)



Diante desses dados, surge uma dúvida quanto à formação de um grupo controle para estudar o comportamento ósseo na MDI: será que todas as reações de remodelação óssea ocorridas em um lado da maxila onde a MDI foi aplicada induz a mudanças fisiológicas no lado contra-lateral?

Estudos experimentais cardiológicos realizados em ratos revelaram que uma lesão originada pelo balão do cateter, induz mudanças fisiológicas tanto na artéria onde o balão foi inserido (ipsi-lateral) quanto na artéria contra-lateral onde não houve procedimento. Foi possível observar que essa lesão desencadeou respostas neurocompensatórias capazes de alterar a inervação perivascular, efeito observado pela presença de neuropeptídeos sensoriais na artéria carótida ipsi-lateral e contra-lateral (Milner *et al.*, 1997).

Kohno *et al.* (2002) usaram o lado contra-lateral de ratos como grupo controle porque os autores acreditavam que as diferenças individuais no crescimento, a tração distal fisiológica e a taxa de movimentação dentária experimental poderiam ser melhor avaliada.

Jhonson (2007) observaram que há diferenças no número e na distribuição de osteoclastos nas regiões de reabsorção da matriz óssea do grupo contra lateral e controle com MDI. O autor inferiu que esse efeito poderia ser resultado da alteração no padrão de mastigação provocado pelos aparelhos utilizados na MDI. O autor sugeriu que em futuros trabalhos fossem feitos grupos controles sem MDI, com a finalidade de permitir comparações adequadas entre condições normais e experimentais coincidentes aos movimentos dentários.

Passados quase sete anos do estudo supracitado, ainda observamos a utilização do lado contra-lateral como grupo controle em pesquisas de MDI,

conforme confirmado na revisão de literatura. Porém, não foi encontrado na literatura se a MDI realizada de um lado da maxila de ratos é capaz de modificar a remodelação óssea do lado contra-lateral a ponto de torná-lo diferente das características de um osso maxilar que não sofreu movimentação alguma e incapacitá-lo de ser usado como controle. Portanto, a hipótese nula ( $H_0$ ) deste estudo será a de que o osso do lado contra-lateral pode ser usado como grupo controle.

### **3.4 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.4.1 Animais**

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (parecer n° 2008-004689) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP. Foram selecionados 12 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com aproximadamente 90 dias e com 300g de massa corporal aproximadamente. Os animais foram mantidos durante o tempo experimental em ambiente com temperatura de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , ração triturada e água sem restrições. Antes dos procedimentos experimentais, os animais foram acondicionados por 7 dias para ambientação, com ciclo de luz de 12/12 horas.

Os animais foram divididos conforme a aplicação de força nas hemi-maxilas: (1) Grupo Controle (GC) – hemi-maxila de um rato sem aplicação de MDI; (2) Grupo movimentado (GM) – hemi-maxila submetida a movimentação dentária induzida; e (3) Grupo Contra-lateral (GCL) – hemi-maxila do lado oposto à movimentação.

#### **3.4.2 Métodos**

#### 3.4.2.1 Instalação e ativação dos dispositivos para MDI no GM

Os procedimentos experimentais foram realizados sob anestesia intramuscular, na dosagem de 80mg/Kg de cloridrato de ketamina (Dopalen, Sespo Ind. e Com. Ltda., Jacareí, SP, Brasil), concomitantemente com o relaxante muscular na dosagem de 10mg/Kg de cloridrato de xilazina (Anasedan, AgribRANDS do Brasil Ltda., Paulínia, SP, Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante.

Os incisivos superiores do lado direito de cada animal do GM passaram pela indução de anquilose por meio da extração, corte da papila dentária e órgão do esmalte, remoção do ligamento periodontal, pulpectomia, obturação com hidróxido de cálcio, selamento do ápice radicular com MTA e reimplante imediato, 15 dias antes da instalação das molas (Cuoghi *et al.*, 2014).

Para a MDI, empregou-se o dispositivo idealizado por Heller e Nanda (1979) modificado pela substituição da mola de aço por níquel-titânio (Sentalloy, GAC, NY, EUA) e inserção de resina fotopolimerizável (Z100, 3M, St. Paul, MN, USA) na região cervical do incisivo direito a fim de melhorar a retenção do fio de aço na região cervical do incisivo previamente reimplantado.

O primeiro molar superior direito foi envolvido com um fio de aço 0,20mm de diâmetro (Morelli, Sorocaba, SP, Brasil), atado a uma mola de secção fechada de 3mm de comprimento, que libera uma força contínua com magnitude de 50cN (Magazine *et al.*, 2010). A mola distendida foi amarrada na parte cervical à resina do incisivo superior direito com fio de aço 0,25mm de diâmetro (Morelli, Sorocaba, SP, Brasil), estabelecendo assim, uma força contínua.

#### 3.4.2.2 Eutanásia e processamento histotécnico

A eutanásia ocorreu por meio de dose excessiva de anestésico após os períodos de 5 dias da aplicação da MDI no GE. O GC também foi eutanasiado após 5 dias, porém sem instalação de dispositivos. As maxilas dos ratos com MDI foram separadas em hemi-maxilas direita (com MDI – GM) e esquerda (sem MDI – GCL). No GC foi utilizada apenas a hemi-maxila direita, pois ambas eram metodologicamente semelhantes. Após a eutanásia, as peças foram processadas e cortadas transversalmente com 6µm de espessura (Olson *et al.*, 2012), sendo que o corte inicial foi determinado a partir da separação de todas as raízes. As lâminas foram capturadas (objetiva de 16 X) por meio de uma lupa estereomicroscópica Stemi 2000C (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) e uma câmera microscópica AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplada ao microscópio óptico (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) e uma fonte de luz transmitida por fibra óptica KL 1500 LCD (Schott, Mainz, Alemanha).

#### *3.4.2.3 Análise histomorfológica da área ocupada por colágeno*

Foi selecionado um corte por animal corado com hematoxilina e eosina. Foi avaliada a região entre as raízes médias e mesiais do primeiro molar, região do septo ósseo interradicular composto de osso trabecular, conforme a metodologia de Tanaka *et al.* (2002) (Figura 1 A-C). Sabe-se que o colágeno é precursor do tecido ósseo e que grandes quantidades de colágeno em um osso são indicativas de neoformação óssea (Hernandes *et al.*, 2012). Portanto, avaliamos a área ocupada por colágeno através do software de análise de imagem Image-Pro Plus® (Versão 4.5, Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Este software pôde calcular automaticamente a área, em micrometros quadrados ( $\mu\text{m}^2$ ), de proteínas coradas

em cada corte definidos por proteínas coradas em cada secção (Cuttle *et al.*, 2005). Primeiramente, foi mensurada a área ocupada por colágeno na região selecionada e logo após foi quantificada a área total da região, para enfim expressar os dados em percentual.

#### **3.4.2.4 Análise Histoquímica**

Para o processamento imunoistoquímico foi utilizado como anticorpo primário a osteoprotegerina (OPG, Goat (cabra) anti-opg - Santa Cruz Biotechnology, SC21038) e a RANKL (Goat anti-rankl - Santa Cruz Biotechnology, SC7627). Como anticorpos secundários utilizamos os anticorpos contra IgG de cabra biotinilado (anti-Goat IgG-HRP, PIERCE). Secções longitudinais de 6 µm das peças anatômicas foram colocadas em lâminas histológicas e desparafinizadas de acordo com protocolo padrão. O padrão de distribuição da imunocoloração foi analisado qualitativamente nas regiões distal e mesial da raiz mesiovestibular, atribuindo-se os scores 0 (sem marcação), 1 (fraca/difusa), 2 (moderada) e 3 (intensa), a fim de avaliar a expressão das proteínas. A análise foi realizada em microscópio óptico convencional e os scores foram atribuídos por um único observador previamente calibrado e cego à procedência dos cortes histológicos com relação aos grupos. Em cada uma dessas regiões foi avaliada a expressão de OPG na face mesial (Figura 1 D-F) e distal (Figura 1 G-I); e RANKL na mesial (Figura 1 J-L) e distal (Figura 1 M-O).

#### **3.4.3 Análise estatística**

Para avaliar a normalidade da amostra, foi utilizado o teste Shapiro-Walk ( $W > 0.05$ ). Os dados percentuais da análise histomorfológica foram expressos em média ( $\bar{X}$ ) e desvio padrão (sd). Foi utilizado o teste Anova e pós-teste Tukey para a comparação entre as hemi-maxilas do GC, GM e GCL (Biostat 5.0, Pará-Brasil) ( $p < 0,05$ ).

Para a análise imunoistoquímica, foram utilizados escores, de acordo com a intensidade da reação celular ao OPG ou Rank-I: (0) não havia reação; (1) reação fraca; (2) reação moderada; e (3) alta reação. A partir destes escores foi feita a frequência percentual (Tabelas 2, 3). Para avaliarmos o valor do score mais frequente, utilizamos a estatística descritiva através da Moda de expressão do Rank-I e do OPG na nossa amostra.

### **3.5 RESULTADOS**

A análise do colágeno mostrou que houve diferença estatisticamente significativa nos percentuais de colágeno entre os GC ( $80\% \pm 0,01$ ) e GM ( $62,2\% \pm 0,15$ ). O lado contra-lateral foi estatisticamente igual aos demais grupos (Tabela 1)

A análise percentual da imunoistoquímica mostrou que a Frequência de score 0 não ocorreu em nenhum dos grupos. O score 3 esteve presente apenas na imunomarcção de RANKL, exceto na face distal da raiz mesiovestibular do GC. O score 1 e 2 ocorreu em todas as imunomarcções de todos os grupos e regiões avaliadas (Tabela 2 e 3).

A Moda mostrou que para a imunomarcção de OPG, o GC e o GCL se comportaram de forma semelhante. Porém, para a RANKL, a face mesial do GCL se

comportou de forma semelhante ao GM e sua face distal diferiu dos demais grupos. A face distal do GC obteve score semelhante a face distal do GM (Figura 1).

### 3.6 DISCUSSÃO

O número e a distribuição de osteoclastos na matriz óssea no grupo contralateral é semelhante ao grupo movimentado (Jhonson, 2007). Ao avaliarmos a quantidade de colágeno e a imunomarcacão para remodelação óssea (RANKL e OPG), observamos algumas semelhanças entre os grupos M e CL.

Sabe-se que as inervações simpática e sensorial estão intimamente relacionadas às células inflamatórias. A estimulação de nervos sensoriais resulta na liberaçãõ de neuropeptídeos como substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina que geram um processo denominado inflamação neurogênica (Richardson and Vasko, 2002). Este processo promove reações em sítios distantes do estímulo ou local da lesão (Black, 2002). Fukada *et al.* (2004) observaram que o implante de colar de silicone em artéria carótida de rato promoveu uma reação na artéria contra-lateral 4 dias após o procedimento, sugerindo a existência de mecanismos compensatórios complexos e pouco conhecidos, ativados na artéria contra-lateral após a injúria vascular da artéria ipsi-lateral.

Durante a movimentação dentária, o LP e os nociceptores locais respondem ao estímulo através da liberaçãõ de neuropeptídios como a Substância P e CGRP (peptídeo relacionado ao gene calcitonina) (Dudic *et al.*, 2006) que agem aumentando a secreção celular de citocinas inflamatórias e aumentam a vasodilataçãõ e vasopermeabilidade (Yamaguchi et al., 2004). Estas respostas nervosas sensoriais são críticas para o movimento dentário ortodôntico. Elas

puderam ser comprovadas em estudos com ratos que realizaram a transecção do nervo alveolar inferior seguido da MDI e como resultado, houve inibição das respostas vasculares e do movimento dentário (Yamashiro *et al.*, 2000). Portanto, é preciso maior atenção na escolha de grupos controle durante os experimentos com MDI, pois podem acontecer mecanismos compensatórios no lado contra-lateral após a aplicação da força.

Em todos os tecidos conjuntivos, os constituintes básicos do osso são uma extensa matriz e diversos tipos celulares que atuam na síntese óssea e contínua remodelação. A matriz óssea é composta por matéria orgânica (sintetizada pelos osteoblastos) reforçada por depósitos inorgânicos de sais de cálcio. As fibras colágenas compreendem cerca de 90% do total de proteínas ósseas que estão orientadas em direções pré-determinadas, conferindo ao osso sua estrutura lamelar. Os outros 10% de matriz orgânica compreendem as proteoglicanas e proteínas de ligação celular (Titorencu *et al.*, 2014).

A análise histológica da área ocupada por colágeno fornece dados sobre a quantidade de neoformação óssea. Portanto, se um determinado osso apresentar uma grande área de colágeno, significa que também existe nesse osso um equilíbrio na remodelação. Ao contrário, se um osso apresentar pouca quantidade de colágeno, o mesmo estará em processo de reabsorção óssea. No presente estudo, o osso alveolar do GC apresentou uma maior porcentagem de colágeno (80%) e o GM apresentou a menor porcentagem (62,2%) (Tabela 1). Porém, o GCL apresentou médias percentuais intermediárias que não diferiram estatisticamente dos demais grupos. Portanto, os dados da análise do colágeno nos que o GC possui



uma equilibrada remodelação contrariamente ao GM e que o GCL se assemelha tanto ao GC quanto ao GM no que se refere à remodelação óssea.

A aplicação de forças mecânicas para a MDI produz no LP regiões de estresse ou tensão com o estabelecimento de áreas de tração ou estiramento (direção oposta ao vetor de força) e áreas de compressão das fibras do LP (mesma direção do vetor de força). O recrutamento e a ativação dos osteoclastos induzem a remoção óssea a partir da área adjacente à compressão do LP e, no lado de tensão, ocorre a aposição óssea pelos osteoblastos (Pizzo *et al.*, 2007). Por meio deste processo de reabsorção e aposição óssea, o dente é então reposicionado (Davidovitch *et al.*, 1988).

As proteínas OPG e RANKL são mediadoras de vários processos celulares, incluindo o metabolismo ósseo. Os osteoblastos regulam a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea ao produzirem OPG e RANKL. Possíveis modificações na integração entre as proteínas OPG e RANK levariam a alteração na qualidade do tecido mineralizado formado (Simonet *et al.*, 1997). A RANKL é uma proteína produzida pelos osteoblastos, células do estroma ósseo, e pelos linfócitos T ativados. Ela pode promover a reabsorção óssea ao ligar-se à RANK na superfície de pré-osteoclastos, estimulando sua diferenciação e ativação em osteoclastos. A OPG é uma proteína também produzida por osteoblastos e células do estroma ósseo, capaz de se ligar a RANKL impedindo sua ligação a RANK (Suda *et al.*, 1999). Ligando-se à RANKL, a OPG inibe a maturação dos osteoclastos, contendo assim a osteoclastogênese e o desenvolvimento de linfócitos (Low *et al.*, 2005). Em nosso estudo, houve uma discrepância de nos escores de OPG e RANKL dos três grupos (Figura 1). Avaliando o mecanismo de ação dessas proteínas, era esperado

que os níveis de OPG na face distal fossem maiores do que os níveis de RANKL, pois durante a MDI esta região está em neoformação óssea. Talvez a imunomarcagem para OPG não seja a melhor forma de avaliar a remodelação óssea, visto que esta proteína é solúvel e difícil de ser detectada na sua totalidade pela imunomarcagem (Khosla, 2001). Sugerimos que para estudos futuros seja feita uma análise molecular (PCR) para avaliar a remodelação óssea.

Muitos terminais nervosos são estimulados durante a MDI nas áreas de tensão e compressão do LP resultando em liberação de neurotransmissores vasoativos. Estes interagem primeiramente com as células endoteliais dos capilares sanguíneos que em resposta expressam receptores que se ligam a leucócitos circulantes promovendo sua migração por diapedese para fora dos capilares. Essas células migratórias secretam muitas moléculas sinalizadoras, como citocinas e fatores de crescimento que estimulam as linhagens celulares do LP e osso alveolar a remodelarem suas matrizes extracelulares (Krishnan and Davidovitch 2006). Em nosso estudo, a imunomarcagem com a proteína RANKL no lado de compressão do LP (correspondente a face mesial da raiz mesiovestibular) mostrou escores iguais para os GCM e GCL, mostrando-nos, mais uma vez, que é duvidoso o uso do lado contra-lateral como grupo controle.

Xu *et al.* (2014) investigaram a expressão de colágeno tipo I e III no LP durante a MDI e usaram como controle o lado contra-lateral. Eles observaram um aumento significativo de colágeno tipo I e tipo III no lado movimentado. Low *et al.* (2005) avaliaram a expressão de RANKL e OPG na reabsorção dentária induzida em ratos pela aplicação de forças pesadas. Os autores também utilizaram o lado contra-lateral como grupo controle e observaram aumento nos níveis de RANKL e

OPG no lado movimentado. Porém, não podemos estender nossos resultados da análise de tecido ósseo para estudos que avaliaram o LP e a reabsorção dentária. Seria de grande importância avaliar o LP e a reabsorção radicular de hemi-maxilas com movimentação, contra-lateral à movimentação e controle, a fim de verificar se o lado contra-lateral pode ser usado como grupo controle nestes estudos.

Diante dos dados analisados, rejeitamos a hipótese nula e concluímos que a MDI aplicada em um dos lados da maxila interfere nas reações do tecido ósseo do lado contra-lateral à movimentação.

### 3.7 Referências

- Ashizawa Y, Sahara N (1998). Quantitative evaluation of newly formed bone in the alveolar wall surrounding the root during the initial stage of experimental tooth movement in the rat. *Arch Oral Biol* 43:473-484.
- Black PH (2002). Stress and the inflammatory response: a review of neurogenic inflammation. *Brain, Behavior, and Immunity* 16:622-653.
- Cuoghi OA, Tondelli PM, Sonoda CK, Aiello CA, de Mendonça MR, Costa SC (2014). Induction of ankylosis in the incisor for orthodontic tooth movement in rats. *Dent Traumatol* 30:112-117.
- Cuttle L, Nataatmadja M, Fraser JF, Kempf M, Kimble RM, Hayes MT (2005). Collagen in the scarless fetal skin wound: detection with picosirius-polarization. *Wound Repair Regen* 13:198–204.
- Davidovitch Z, Nicolay OF, Ngan PW, Shanfeld JL (1988). Neurotransmitters, cytokines, and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics. *Dent Clin North Am* 32:411–35.
- De Carlos F, Cobo J, Diaz-Esnal B, Arguelles J, Vijande M, Costales M (2006). Orthodontic tooth movement after inhibition of cyclooxygenase-2. *Am J Orthod Dent Orthop* 129:402-406.
- Deguchi T, Takano-Yamamoto T, Yabuuchi T, Ando R, Roberts WE, Garetto LP (2008). Histomorphometric evaluation of alveolar bone turnover between the maxilla and the mandible during experimental tooth movement dogs. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 133:889-97.

- Drevensek M, Volk J, Sproggar S, Drevensek G (2009). Orthodontic force decreases the eruption rate of rat incisors. *Eur J Orthod* 31:46-50.
- Dudic A, Kiliaridis S, Mombelli A, Giannopoulou C (2006). Composition changes of gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: comparisons between tension and compression sides. *Eur J Oral Sci* 114:416-422.
- Fukada S, Corrêa F, Ramalho L, Mizusaki C, DE Oliveira AM (2004). Perivascular injury leads to a reduction in vascular reactivity of the collared and to an enhancement on contra-lateral carotid artery of rats. *Cardiovascular Pathology* 13:251-259.
- Guajardo G, Okamoto Y, Gogen H, Shanfeld JL, Dobeck J, Herring AH, *et al.* (2000). Immunohistochemical localization of epidermal growth factor in cat paradental tissues during tooth movement. *Am J Orthod Dent Orthop* 118:210-219.
- Heller IJ, Nanda R (1979). Affect of metabolic alteration of periodontal fibers on orthodontic tooth movement. An experimental study. *Am J Orthod* 75:239-58.
- Hernandes L, Ramos AL, Micheletti KR, Santi AP, Cuoghi OA, Salazar M (2012). Densitometry, radiography, and histological assessment of collagen as methods to evaluate femoral bones in an experimental model of osteoporosis. *Osteoporos Int* 23:467-473.
- Johnson RB (2007). Osteoclast distribution within the rat interdental septum coincident to experimental tooth movement using light forces. *The Anatomical Record* 290:74-82.
- Kawarizadeh A, Bourauel C, Zhang D, Götz W, Jäger A (2004). Correlation of stress and strain profiles and the distribution of osteoclastic cells induced by orthodontic loading in rat. *Eur J Oral Sci* 112:140-147.
- Kiliç N, Oktay H, Ersöz M (2010). Effects os force magnitude on tooth movement: an experimental study in rabbits. *Eur J Orthod* 32:154-158.
- Kogure K, Noda K (2009). Periodontal response to experimental tooth movement by interrupted orthodontic force in rats. *Orthod Waves* 68:97-106.
- Kohno T, Matsumoto Y, Kanno Z, Warita H, Soma K (2002). Experimental tooth movement under light orthodontic forces: rates of tooth movement and changes of the periodontium. *J Orthod* 29:129-135.
- Khosla S (2001). Minireview: The OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 142:5050-5055.
- Krishnan V, Davidovitch Z (2006). Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 129:469e.1-460e.32.
- Low E, Zoellner H, Kharbanda OP, Darendeliler MA (2005). Expression of mRNA for osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappa  $\beta$  ligand (RANKL)

during root resorption induced by the application of heavy orthodontic forces on rat molars. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 128:497-503.

Maganzini AL, Wong AM, Ahmed MK (2010). Forces of various nickel titanium closed coil springs. *Angle Orthod* 80:182-7.

Milner P, Crowe R, Loesch A, Angling S, Burnstock G, Mcewan JR (1997). Neurocompensatory responses to balloon-catheter-induced injury of the rat carotid artery. *Journal of Vascular Research* 34:31-40.

Tamatsu Y, Kaimoto K, Arai M, Ide Y (1996). Properties of the elastic modulus from buccal compact bone of human mandible. *Bull Tokyo Dent Coll* 37:93-10.

Olson C, Uribe F, Kalajzic Z, Utreja A, Nanda R, Rowe D, et al. (2012) Orthodontic tooth movement causes decreased promoter expression of collagen type I, bone sialoprotein and alpha-smooth muscle actin in the periodontal ligament. *Orthod Craniofac Res* 15:52-61.

Pillon JJ, Kuijpers-Jagtman AM, Maltha JC (1996) Magnitude of orthodontic forces and the rate of bodily tooth movement. An experimental study. *Am J Orthod Dent Orthop* 110:16-23.

Pizzo G, Licata ME, Guiglia R, Giuliana G (2007). Root resorption and orthodontic treatment: review of the literature. *Minerva Stomatol* 56:31-44.

Richardson JD, Vasko MR (2002). Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. *Journal of Pharmacology Experimental Therapy* 302:839-845.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, et al. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in regulation of bone density. *Cell* 89:309-19.

Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ (1999). Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endoc Rev* 20:345-57.

Tanaka M, Ejiri S, Toyooka E, Kohno S, Ozawa H (2002). Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone. *J Periodont Res* 37:161-165.

Titorencu I, Pruna V, Jinga VV, Simionescu M (2014). Osteoblast osteogeny and implications for the bone pathology: an overview. *Cell Tissue Res* 355:23-33.

Van Leeuwen EJ, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM (1999). Tooth movement with light continuous and discontinuous forces in beagle dogs. *European Journal of Oral Science* 107:468-474.

Verna C, Dalstra M, Lee TC, Cattaneo PM, Melsen B (2004). Microcracks in the alveolar bone following orthodontic tooth movement: a morphological and morphometric study. *Eur J Orthod* 26:459-467.

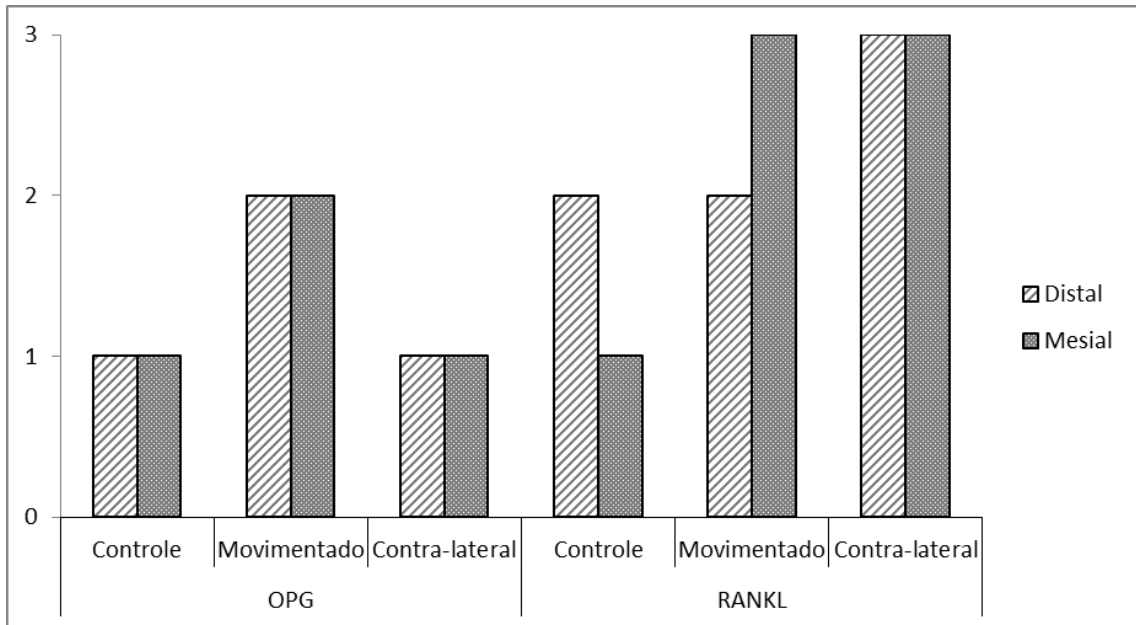
Von Böhl M, Maltha JC, Von Den Hoff JW, Kuijpers-Jagtman AM. Focal hyalinization during experimental tooth movement in beagle dogs. *Am J Orthod Dent Orthop*. 2004;125:615-623.

Yamaguchi M, Kojima T, Kanekawa M, Aihara N, Nogimura A, Kasai K (2004). Neuropeptides stimulate production of interleukin 1 $\beta$ , interleukin 6 and tumor necrosis factor in human dental pulp cells. *Inflamm Res* 53:199-204.

Yamashiro T, Fugiyama K, Fukunaga T, Wang Y (2000). Epithelial rests of Malassez express immunoreactivity of Trk A and its distribution is regulated by sensory nerve innervation. *J Histochem Cytochem* 48:979-984.

Xu H, Han X, Meng Y, Gao L, Guo Y, Jing Y, et al. (2014). Favorable effect of myofibroblasts on collagen synthesis and osteocalcin production in the periodontal ligament. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 145:469-479.



*Figuras*

**Figura 1:** Moda dos imunomarcadores OPG e RANKL nos grupos controle, Movimentado e contra lateral.





*Tabelas*

**Tabela 1:** Média (X) e desvio padrão (sd) do percentual da área ocupada por colágeno nos grupos Controle, Movimentado e Contra-lateral: Anova e pós-teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

<b>Controle</b>	<b>Movimentado</b>	<b>Contra-lateral</b>	
<b>X (sd)</b>	<b>X (sd)</b>	<b>X (sd)</b>	<b>P</b>
80% (0,01) <i>a</i>	62,2% (0,15) <i>b</i>	75,4% (0,04) <i>ab</i>	0,02*

**Tabela 2.** Porcentagem da frequência dos scores (0, 1, 2, 3) de OPG nos grupos Controle, Movimentado e contra-lateral das faces distal e mesial da raiz mesiovestibular do primeiro molar superior.

<b>OPG Distal</b>			
	Controle	Movimentado	Contra-lateral
0	0%	0%	0%
1	60%	30%	80%
2	30%	60%	20%
3	0%	0%	0%
<b>OPG Mesial</b>			
	Controle	Movimentado	Contra-lateral
0	0%	0%	0%
1	80%	30%	60%
2	10%	60%	40%
3	0%	0%	0%

**Tabela 3.** Porcentagem da frequência dos scores (0, 1, 2, 3) de OPG nos grupos Controle, Movimentado e contra-lateral das faces distal e mesial da raiz mesiovestibular do primeiro molar superior.

<b>RANKL Distal</b>			
	Controle	Movimentado	Contra-lateral
0	0%	0%	0%
1	20%	30%	0%
2	80%	30%	30%
3	0%	30%	60%
<b>RANKL Mesial</b>			
	Controle	Movimentado	Contra-lateral
0	0%	0%	0%
1	60%	30%	0%
2	20%	10%	50%
3	20%	50%	50%



## Anexo I



## ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY

A Multidisciplinary Journal of Oral & Craniofacial Sciences

### AUTHOR INFORMATION PACK

#### TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.3
• Guide for Authors	p.4



#### DESCRIPTION

*Archives of Oral Biology* operates a web-based submission and review system. Please register at <http://ees.elsevier.com/aob> to submit a paper.

*Archives of Oral Biology* is an international journal which aims to publish papers of the highest scientific quality in the **oral** and **craniofacial** sciences. The journal is particularly interested in research which advances knowledge in the mechanisms of **craniofacial development** and **disease**, including:

- Cell and molecular biology
- Molecular genetics
- Immunology
- Pathogenesis
- Cellular microbiology
- Embryology
- Syndromology
- Forensic dentistry

The aim is to be inclusive and multidisciplinary and papers are also welcome in the fields of structure and function of craniofacial tissues over the whole range of vertebrates including studies concerned with palaeontology and comparative anatomy. *Archives of Oral Biology* will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will only consider clinical papers where they make a significant contribution to the understanding of a disease process.

#### AUDIENCE

Oral biologists, physiologists, anatomists, pathologists.

#### IMPACT FACTOR

2014: 1.735 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015

*4 CAPÍTULO 2*

## REMODELAÇÃO ÓSSEA COM AS FORÇAS CONTÍNUA, CONTÍNUA INTERROMPIDA E INTERMITENTE: MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA INDUZIDA EM RATOS

Osmar Aparecido Cuoghi<sup>a</sup>, Kelly Regina Micheletti<sup>b</sup>, Yésselin Margot Miranda-Zamalloa<sup>b</sup>, Marcos Rogério de Mendonça<sup>a</sup>, Roberta Okamoto<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Professor Adjunto do Departamento de Odontologia Infantil e Social, Disciplina de Ortodontia Preventiva, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Univ. Estadual Paulista – UNESP.

<sup>b</sup> Doutoranda pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Univ. Estadual Paulista – UNESP.

<sup>c</sup> Professora Assistente do Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Univ. Estadual Paulista – UNESP.

Palavras-chave: Movimentação dentária. Ratos. Osso.

Keywords: Tooth movement. Rats. Bone.

### ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Osmar Aparecido Cuoghi

Departamento de Odontologia Infantil e Social - Disciplina de Ortodontia Preventiva -  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

Rua José Bonifácio 1193, CEP 16015-050, Araçatuba, SP, Brazil

Tel: +55 (18) 3636-3236

e-mail: osmar@foa.unesp.br



Micheletti KR. Remodelação óssea com as forças contínua, contínua interrompida e intermitente: movimentação dentária induzida em ratos [Tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2015.

#### 4.1 RESUMO

**Introdução:** A aplicação de diferentes tipos de força pode provocar comportamentos distintos no osso alveolar. **Objetivo:** avaliar a variação da quantidade de tecido ósseo frente a aplicação dos diferentes tipos de força em molares murinos. **Métodos:** Utilizou-se 60 ratos machos (Wistar-Rattus norvegicus), com aproximadamente 90 dias de idade e peso de 300g, divididos em 4 grupos de acordo com o tipo de força; Grupos controle (C), força contínua (FC), força contínua interrompida (FCI) e força intermitente (FI). As forças foram aplicadas nos períodos de 5, 7 e 9 dias (n=6) e analisou-se a quantidade de tecido ósseo alveolar. Os dados foram tabulados e realizou-se o teste estatístico com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). **Resultados:** A análise do tecido ósseo inter-grupos mostrou que aos 5 dias de MDI houve diminuição significativa dos percentuais de osso dos grupos FC ( $62\% \pm 0,14$ ), FCI ( $55\% \pm 0,07$ ) e FI ( $54\% \pm 0,05$ ) em relação ao grupo C ( $80\% \pm 0,01$ ) ( $p < 0,05$ ). Aos 7 dias de movimentação, essa diminuição ainda era significativa nos grupos FC ( $64\% \pm 0,1$ ) e o FI ( $38\% \pm 0,1$ ) quando comparados ao grupo C ( $80\% \pm 0,01$ ) e também houve diferença estatisticamente significativa entre o FC ( $64\% \pm 0,1$ ) e FI ( $38\% \pm 0,1$ ) ( $p < 0,05$ ). Aos 9 dias de movimentação, essa diminuição foi significativa entre os grupos FC ( $68\% \pm 0,03$ ) e FCI ( $51\% \pm 0,13$ ), e C ( $80\% \pm 0,01$ ) e FCI ( $51\% \pm 0,13$ ). A análise do tecido ósseo intra-grupos revelou uma manutenção nos níveis de osso no grupo FC. Uma perda de osso significativa no grupo FCI sétimo ao nono dia ( $p < 0,05$ ) e um ganho seguido de uma perda óssea no grupo FI ( $p < 0,05$ ). A imunomarcagem confirmou todos esses resultados. **Conclusões:** A FC não variou sua massa óssea significativamente durante os períodos experimentais e se igualou estatisticamente ao GC no nono dia. A FI teve sua massa óssea diminuída significativamente ao sétimo dia devido a reativação do dispositivo ortodôntico e provável interrupção do processo de remodelação óssea, evento também observado na FCI após os sete dias de movimentação.

**Palavras-chave:** Movimentação dentária. Ratos. Osso.

Micheletti KR. Bone remodeling with continuous, interrupted continuous and intermittent forces: tooth movement in rats [Thesis]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2015.

## 4.2 ABSTRACT

**Introduction:** There are few researches about the behavior of the alveolar bone in relationship of three different types of forces. **Objective:** To evaluate the amount of bone tissue during the application of different types of force in rats molars. **Methods:** 60 male rats (*Rattus norvegicus* Wistar), with approximately 90 days of age and weight of 300g, divided into 4 groups according to the type of force: control group (C), continuous force (CF), intermittent continuous force (ICF) and interrupted force (IF); The groups were distributed in periods of 5, 7 and 9 days (n = 6). Were analyzed the amount of bone tissue of right upper first molar. The evaluation were conducted with Anova and Tukey's tests a significance level of 5% (p <0.05). **Results:** The intergroup bone tissue analysis showed that the five days of induced tooth movement (ITM) was no significant decrease in bone percentage of CF groups (62% ± 0.14), ICF (55% ± 0.07) and IF (54% ± 0.05) in the C group (80% ± 0.01) (p <0.05). At 7 days of ITM, this reduction was still significant in the CF group (64% ± 0.1) and IF (38% ± 0.1) compared to C group (80% ± 0.01) and there was also difference statistically significant between CF (64 ± 0.1%) and IF (38% ± 0.1) (p <0.05). After 9 days of ITM, this decrease was significant between the CF group (68% ± 0.03) and ICF (51% ± 0.13), C (80% ± 0.01) and ICF (51% ± 0.13). The intra-group analysis showed a bone maintenance in bone levels in the CF group. A significant bone loss in ICF seventh to ninth day group (p <0.05) and a gain followed by a bone loss in IF group (p <0.05). The immunolabelling confirmed all these results. **Conclusions:** The CF did not change significantly their bone mass during trial periods and statistically matched the CG on the ninth day. The IF had a decreased bone mass significantly the seventh day due to reactivation of orthodontic appliance and probable interruption of the process of bone remodeling, event also observed in the FCI after the seven-day drive.

**Key Words:** Tooth movement. Rats. Bone.

### 4.3 INTRODUÇÃO<sup>2</sup>

Clínicos e pesquisadores têm observado diferenças individuais na quantidade e nível de movimento ortodôntico com relação ao mesmo tipo de força usado.<sup>1-3</sup> A força aplicada durante a movimentação dentária induzida (MDI) forma regiões de estresse ou tensão no ligamento periodontal que estabelecem áreas de tração e de compressão.<sup>4-8</sup>

As forças são vetores caracterizados por magnitude, direção e duração.<sup>9</sup> De acordo com a duração da força, esta pode ser aplicada de forma contínua (sem interrupções), contínua interrompida ou intermitente.<sup>10</sup>

A FC mantém a magnitude de força durante um longo período e frequentemente é produzida por fios e molas super-elásticos. Os fios super-elásticos possuem alto limite elástico e memória de forma, como a liga de níquel-titânio (NiTi). Esses fios têm sido usados amplamente para os tratamentos ortodônticos, objetivando desempenhar forças de baixa magnitude e contínua. Além do mais, podem ser utilizados por períodos maiores e segundo Gil & Planell (1998), apresentam respostas biológicas desejáveis.

Se a força contínua cessa, porém o dispositivo ortodôntico é mantido em posição, atingindo um nível incapaz de produzir movimentação dentária, essa força é classificada como FCI.<sup>12</sup>

---

<sup>2</sup> O texto foi escrito no formato de artigo, segundo as normas da Revista American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics (Anexo I).

Por outro lado, se uma força é eliminada totalmente com a remoção do dispositivo, classifica-se como FI. Esta força é observada normalmente em dispositivos ortodônticos removíveis.<sup>13</sup>

Reitan (1957) observou em dentes humanos que a degeneração tecidual hialinizada induzida pela FI foi absorvida mais rapidamente quando comparada a FC dissipante. Porém, Ballard et al. (2009) relataram que a FCI pode ser considerada mais favorável, especialmente em relação ao menor predominância de reabsorção radicular. Adicionalmente, Cuoghi et al. (2014) observaram que apesar da FCI apresentar valores intermediários de reabsorção radicular quando comparada a FC e FI, isso não descarta a possibilidade de reabsorção radicular na FCI.

A investigação de forças contínuas e intermitentes, com diferentes intensidades, durante a movimentação dentária, demonstrou que o tipo da força tem mais influência do que sua magnitude.<sup>2</sup> Portanto, dependendo do tipo de força aplicada a um dente, ocorre um estímulo mecânico no ligamento periodontal (LP) que promove o estresse celular, resultando em alterações ósseas.<sup>17</sup> Porém, não existem relatos sobre a variação da quantidade de osso alveolar após a aplicação das forças contínua, contínua interrompida e intermitente.

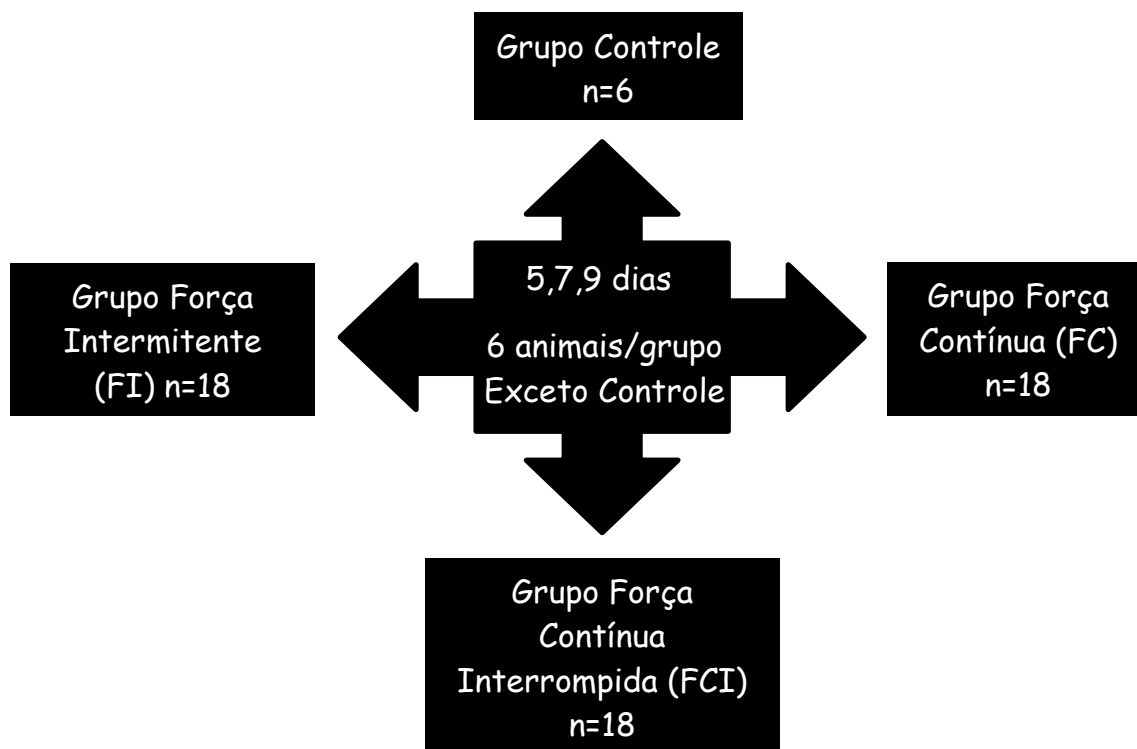
Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a variação da quantidade de tecido ósseo frente a aplicação dos diferentes tipos de força em molares murinos.

## **4.4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.4.1 Animais**

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (parecer nº 2012-01092) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP. Foram selecionados 60 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com aproximadamente 90 dias e com 300g de massa corporal. Os animais foram mantidos durante o tempo experimental em ambiente com temperatura de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , ração triturada e água sem restrições. Antes dos procedimentos experimentais, os animais foram acondicionados por 7 dias para ambientação, com ciclo de luz de 12/12 horas.

Os animais foram divididos em quatro grupos:



Os grupos FC (Figura 1A), FCI (Figura 1B) e FI (Figura 1C) foram subdivididos de acordo com o período total de movimentação, 5, 7 e 9 dias (n=6/dia)

e os primeiros molares superiores do lado direito foram submetidos à MDI e ancorados aos incisivos superiores anquilosados do mesmo lado.

O grupo Controle (C) foi composto de 6 ratos que não tiveram seus molares movimentados, porém, foram submetidos a anquilose dentária como os demais grupos.

#### **4.4.2 Métodos**

##### *4.4.2.1 Instalação e ativação dos dispositivos para MDI*

Os procedimentos experimentais foram realizados sob anestesia intramuscular, na dosagem de 80mg/Kg de cloridrato de ketamina (Dopalen, Sespo Ind. e Com. Ltda., Jacareí, SP, Brasil), concomitantemente com o relaxante muscular na dosagem de 10mg/Kg de cloridrato de xilazina (Anasedan, Agribands do Brasil Ltda., Paulínia, SP, Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante.

O incisivo superior do lado direito de cada animal passou pelo procedimento de anquilose para obtenção de uma ancoragem total da movimentação do primeiro molar (Figura 2).<sup>18</sup> A anquilose foi determinada clinicamente e histologicamente (Figura 3). Quinze dias após a anquilose, foi instalada a mola para a MDI nos grupos FC, FCI e FI (Figura 4). Para a MDI, empregou-se o dispositivo ortodôntico de níquel-titânio (Sentalloy, GAC, NY, EUA).<sup>16</sup> A intensidade de força utilizada foi de 50cN, considerada por Gonzales et al. (2008) como uma força leve.

##### *4.4.2.2 Eutanásia e processamento histotécnico*

A eutanásia ocorreu por meio de dose excessiva de anestésico após os períodos experimentais. O grupo C também foi submetido à eutanásia após 5 dias, porém sem instalação de dispositivos. As maxilas foram processadas e cortadas transversalmente com 6  $\mu\text{m}$  de espessura,<sup>17</sup> sendo que o corte inicial foi determinado a partir da separação de todas as raízes dos dentes superiores onde a crista óssea alveolar já estava evidente. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina e posteriormente capturadas (objetiva de 10X) por meio de uma lupa estereomicroscópica Stemi 2000C (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) e uma câmera microscópica AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplada ao microscópio óptico (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) e uma fonte de luz transmitida por fibra óptica KL 1500 LCD (Schott, Mainz, Alemanha).

#### *4.4.2.3 Estabelecimento das diretrizes para as análises*

A análise da área ocupada por tecido ósseo foi realizada na região de crista óssea alveolar situada entre as raízes médias e distais do primeiro molar superior direito (Figura 5A). A análise da Imunoistoquímica foi realizada no tecido ósseo alveolar situado à mesial e à distal da raiz mesiovestibular do primeiro molar superior direito (Figura 5B).

#### *4.4.2.4 Análise histométrica da área ocupada por tecido ósseo*

Foi avaliada a região entre as raízes médias e mesiais do primeiro molar, região do septo ósseo interradicular composto de osso trabecular, conforme a metodologia de Tanaka et al. (2002) (Figura 6 A-E). Foi quantificada a área ocupada por tecido ósseo através do software de análise de imagem Image-Pro Plus®

(Versão 4.5, Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Este software pôde calcular automaticamente a área, em micrometros quadrados ( $\mu\text{m}^2$ ), de proteínas coradas em cada corte definidos por proteínas coradas em cada secção.<sup>21</sup> Primeiramente, foi mensurada a área ocupada por tecido ósseo na região selecionada e logo após foi quantificada a área total da região, para enfim expressar os dados em percentual.

#### *4.4.2.5 Análise histoquímica*

Para o processamento imunoistoquímico foi utilizado como anticorpo primário a osteoprotegerina (OPG, Goat (cabra) anti-opg - Santa Cruz Biotechnology, SC21038) e a RANKL (Goat anti-rankl - Santa Cruz Biotechnology, SC7627). Como anticorpos secundários utilizamos os anticorpos contra IgG de cabra biotinilado (anti-Goat IgG-HRP, PIERCE). Secções longitudinais de 6  $\mu\text{m}$  das peças anatômicas foram colocadas em lâminas histológicas e desparafinizadas de acordo com protocolo padrão. O padrão de distribuição da imunocoloração foi analisado qualitativamente nas regiões distal e mesial da raiz mesiovestibular, atribuindo-se os scores 0 (sem marcação), 1 (fraca/difusa), 2 (moderada) e 3 (intensa), a fim de avaliar a expressão das proteínas. A análise foi realizada em microscópio óptico convencional e os scores foram atribuídos por um único observador previamente calibrado e cego à procedência dos cortes histológicos com relação aos grupos. Em cada uma dessas regiões foi avaliada a expressão de OPG na face mesial e distal; e RANKL na mesial e distal (Figura 7).

#### **4.4.3 Métodos estatísticos**



Para avaliar a normalidade dos dados, foi utilizado o teste Shapiro-Wilk ( $P > 0.05$ ).

Todas as análises foram realizadas por um único examinador. Após a análise de toda a amostra, foram selecionados aleatoriamente 24 cortes e reavaliados após uma semana da primeira análise para o cálculo do erro do método da análise do colágeno ósseo. O erro sistemático intra-examinador foi calculado com o Teste Wilcoxon. O erro casual foi determinado usando o cálculo do erro proposto por Dahlberg.

Não foram observados erros sistemáticos ou casuais e os resultados foram considerados aceitáveis dentro dos parâmetros aos quais foram obtidos, indicando, assim, a confiabilidade do método.

Os dados percentuais da análise histomorfológica foram expressos em média ( $\bar{X}$ ) e desvio padrão (sd). Foi utilizado o teste Anova e pós-teste Tukey para a comparação entre os grupos C, FC e FCI e FI e intra-grupos (Biostat 5.0, Pará-Brasil) ( $p < 0,05$ ).

Para a análise imunoistoquímica, foram utilizados escores e a partir destes escores foi feita a frequência percentual. Para avaliarmos o valor do score mais frequente, utilizamos a estatística descritiva através da Moda de expressão do Rank-I e do OPG na nossa amostra. A comparação entre o OPG e RANKL nos elucidou a quantidade de remodelação óssea.

#### **4.5 RESULTADOS**

O poder do teste foi confirmado pelo Test-t para amostras independentes (n=6/grupo).

A análise do tecido ósseo inter-grupos mostrou que aos 5 dias de MDI houve diminuição significativa dos percentuais de osso dos grupos FC (62%  $\pm$ 0,14), FCI (55%  $\pm$ 0,07) e FI (54%  $\pm$ 0,05) em relação ao grupo C (80%  $\pm$  0,01) ( $p < 0,05$ ). Aos 7 dias de movimentação, essa diminuição ainda era significativa nos grupos FC (64%  $\pm$  0,1) e o FI (38%  $\pm$  0,1) quando comparados ao grupo C (80%  $\pm$  0,01) e também houve diferença estatisticamente significativa entre o FC (64%  $\pm$  0,1) e FI (38%  $\pm$  0,1) ( $p < 0,05$ ). Aos 9 dias de movimentação, essa diminuição foi significativa entre os grupos FC (68%  $\pm$  0,03) e FCI (51%  $\pm$  0,13) e C (80%  $\pm$  0,01) e FCI (51%  $\pm$  0,13) (Tabela 1, Figura 8 e 9).

A análise do tecido ósseo intra-grupos revelou uma manutenção nos níveis de osso no grupo FC e uma perda de osso significativa no grupo FCI sétimo ao nono dia ( $p < 0,05$ ) e um ganho seguido de uma perda óssea no grupo FI ( $p < 0,05$ ).

A Moda aplicada aos resultados da análise da imunomarcagem confirmaram todos os resultados descritos na figura 8 (Figura 10, 11 e 12).

#### **4.6 DISCUSSÃO**

A MDI é mais rápida quando aplicada em osso com quantidade de osso reduzida.<sup>22</sup> Shitano et al. (2013) observou em ratos que a MDI foi acelerada nos três primeiros dias de aplicação da FC. Este dado pode estar relacionado a diminuição

da quantidade de tecido ósseo em todos os grupos com MDI aos cinco dias de aplicação de força.

Se uma força é aplicada a um molar de rato, o seu osso alveolar tem um período de remodelação equivalente a oito dias após a aplicação da força.<sup>7,23</sup> Nesse estudo, a FI apresentou massa óssea significativamente menor do que os demais grupos. A explicação está no fato de que ao terceiro dia a mola foi removida e reintroduzida ao quinto dia e se manteve em força contínua até o sétimo dia. Portanto, essa nova ação de força (força contínua) aos cinco dias impossibilitou o osso alveolar de completar seu processo de remodelação que ocorreria aos oito dias de movimentação. Ainda segundo Shitano et al. (2013) e King et al. (1991), no período de 7 dias de MDI (muito próximo ao nível de remodelação máxima) a FCI apresenta respostas ósseas mais semelhantes ao grupo controle, dado semelhante ao nosso estudo.

A proteína receptora RANKL é reguladora da formação e ativação de osteoclastos. Através dela, muitos hormônios e citocinas produzem o seu efeito de reabsorção óssea. O OPG é um receptor produzido por osteoblastos, e concorre com RANK para a ligação RANKL. Os efeitos biológicos de OPG em células de osso incluem a inibição das fases terminais da diferenciação de osteoclastos, a supressão da ativação de osteoclastos e a indução de apoptose. Assim, a remodelação óssea é controlada por um equilíbrio na ligação entre RANK-RANKL e produção de OPG.<sup>24</sup> A MDI produz forças de tração no LP no lado contrário ao movimento e compressão no LP na região para onde o movimento está acontecendo. Na região de tração, a neoformação está mais presente do que a reabsorção e na região de compressão, a reabsorção.<sup>25</sup> Em nosso estudo, o OPG de todos os grupos, quando comparado ao

grupo controle, apresentou escores maiores na face distal da raiz (lado de tração do LP), área onde a neoformação óssea deveria ser mais evidente do que a reabsorção, comprovando o movimento mesial do molar.

Contrariamente, observou-se no grupo controle que o escore de RANKL na face distal da raiz foi maior do que o escore de OPG. Esses dados podem ser explicados pelo estudo de Tsuchiya et al. (2004) no qual eles relataram que os molares de ratos apresentam um movimento distal fisiológico. Porém, esse movimento não invalida nas nossas conclusões, pois a tração molar distal não pode ser medida separadamente devido o deslocamento dentário ser relativamente pequeno (6,7  $\mu\text{m}/\text{dia}$ ).<sup>7</sup>

A MDI em áreas de grande densidade óssea está associada a maiores taxas de reabsorção dentária.<sup>27</sup> Durante a aplicação da MDI, as cristas ósseas, principalmente as triangulares, absorvem parte da força, havendo uma maior tendência em distribuir a força resultando em menores riscos de lesão da camada de cementoblastos e reabsorção radicular.<sup>16</sup> De acordo com a quantidade de tecido ósseo, vimos que nos períodos de sete e nove dias, alguns grupos com MDI aproximaram seus valores de massa óssea aos valores do grupo C (7 dias:  $C = FCI/$  9 dias:  $C = FC = FI$ ), tornando-se estatisticamente iguais. Portanto, se a maior densidade óssea resulta em maior probabilidade de reabsorção dentária, provavelmente nestes grupos a taxa de reabsorção dentária seria maior. Em ratos, o processo de remodelação óssea se completa após 8 dias da MDI com FC.<sup>23</sup> Talvez seja verídica a inferência de que quando a FC é aplicada e removida antes do osso sofrer remodelação óssea (método usado para simular aparelhos removíveis correspondente a FI) ocorra menor taxa de reabsorção dentária.

Adicionalmente em relação à reabsorção radicular, Ballard et al. (2009) comparou FI e FC em humanos com uma intensidade de força de 225cN e observou que a FC apresentou maiores quantidades de reabsorção radicular. Além deste dado, Cuoghi et al. (2014) aplicou uma intensidade de força de 50cN em ratos e constatou que a FC também teve maior porcentagem de reabsorção radicular do que a FCI. Neste estudo, a FC tem a maior massa óssea aos sete e aos nove dias e ela recupera esses níveis se igualando grupo C. Provavelmente, a reabsorção dentária com FC descrita nos estudo de Ballard et al. (2009) e Cuoghi et al. (2014) seja resultado da maior quantidade de massa óssea presente na FC como observado neste estudo.

Todavia, a quantidade de massa óssea alveolar pode estar diminuída (osteopenia) não por estímulo físico, mas por algum problema metabólico, como nos casos de supressão de estrógeno, evento comum nas mulheres no período de menopausa. Porém, se uma força é aplicada nesse osso há um consequente aumento da quantidade de movimentação dentária devido a menor resistência óssea.<sup>22,28</sup> Nessas condições, a taxa de movimento dentário pode ser determinada pela capacidade remodeladora do osso alveolar que será baixa diante dessas condições.<sup>29</sup> Dentre todas as forças analisadas neste estudo, a FC apresentou, a maior quantidade de massa óssea em todos os períodos. A FCI e a FI apresentaram, durante algumas fases do experimento, perdas ósseas significantes (tabela 2).

Portanto, seria importante que clinicamente a atenção fosse redobrada diante de pacientes com osteopenia ou reabsorções radiculares. A força contínua poderia ajudar os pacientes com osteopenia perderem menos osso durante a MDI. As forças

contínua interrompida e intermitente poderiam diminuir o processo de reabsorção radicular por proporcionarem perdas ósseas maiores durante o tratamento ortodôntico. Diante desses dados, sugere-se que essa metodologia seja repetida em humanos.

#### **4.7 CONCLUSÕES**

A FC não variou sua massa óssea significativamente durante os períodos experimentais e se igualou estatisticamente ao GC no nono dia.

A FI teve sua massa óssea diminuída significativamente ao sétimo dia devido a reativação do dispositivo ortodôntico e provável interrupção do processo de remodelação óssea, evento também observado na FCI após os sete dias de movimentação.

#### **4.8 REFERÊNCIAS**

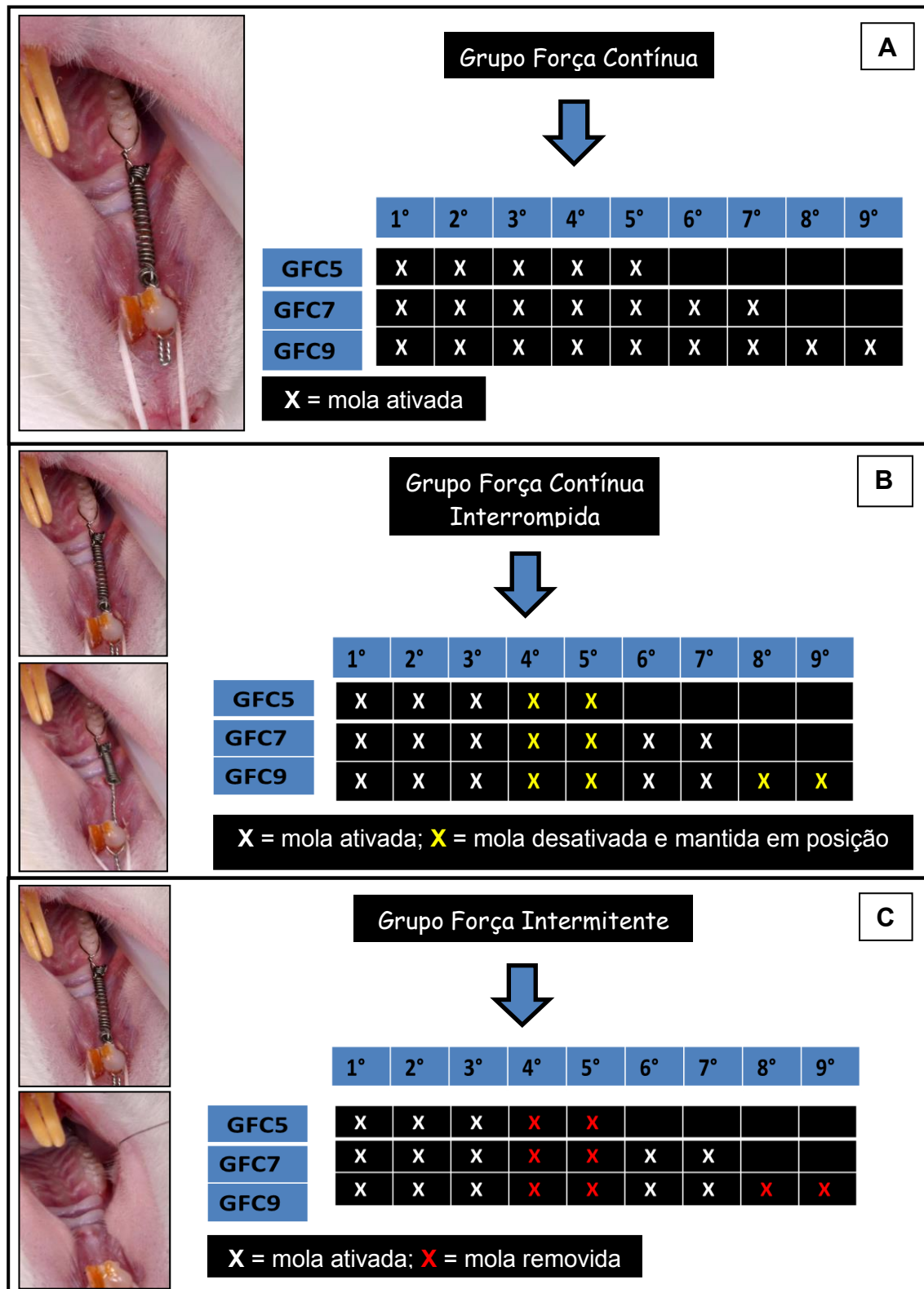
1. Pillon JJ, Kuijpers-Jagtman AM, Maltha JC. Magnitude of orthodontic forces and the rate of bodily tooth movement. An experimental study. *Am J Orthod Dent Orthop* 1996;110:16-23.
2. van Leeuwen EJ, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. Tooth movement with light continuous and discontinuous forces in beagle dogs. *European Journal of Oral Science* 1999;107:468-474.
3. von Böhl M, Maltha JC, Von Den Hoff JW, Kuijpers-Jagtman AM. Focal hyalinization during experimental tooth movement in beagle dogs. *Am J Orthod Dent Orthop* 2004;125:615-623.
4. Pizzo G, Licata ME, Guiglia R, Giuliana G. Root resorption and orthodontic treatment: review of the literatura. *Minerva Stomatol* 2007;56:31-44.
5. Trope M. Root resorption of dental and traumatic origin: classification based on etiology. *Pract Periodontics Aesthet Dent* 1998;10:515-22.
6. Melsen B. Biological reaction of alveolar bone to orthodontic tooth movement. *Angle Orthod* 1999;69:151-8.

7. King GJ, Keeling SD, Wronski TJ. Histomorphometric study of alveolar bone turnover in orthodontic tooth movement. *Bone* 1991;12:401–9.
8. Brezniak N, Wasserstein A. Root resorption after orthodontic treatment part 1. Literature review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1993;103:62–6.
9. Isaacson RJ, Lindauer SJ, Davidovitch M. The ground rules for arch wire design. *Semin Orthod* 1995;1:3-11
10. Hayashi H, Konoo T, Yamaguchi K. Intermittent 8-hour activation in orthodontic molar movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2004;125:302-309.
11. Gil FJ, Planell JA. Shape memory alloys for medical applications. *Proc Inst Mech Eng H* 1998;212:473–88.
12. Owman-Moll P, Kurol J, Lundgren D. Continuous versus interrupted continuous orthodontic force related to early tooth movement and root resorption. *Angle Orthod* 1995;65:395-402.
13. Krishnan V, Davidovich Z. Cellular, molecular and tissue-level reactions to orthodontic forces. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006;129:469. e1-32.
14. Reitan K. Some factors determining the evaluation of forces in orthodontics. *Am J Orthod* 1957;43:32-45.
15. Ballard DJ, Jones AS, Petocz P, Darendeliler MA. Physical properties of root cementum: Part 11. Continuous vs. intermittent controlled orthodontic forces on root resorption. A microcomputed-tomography study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2009 Jul;136(1):8.e1-8; discussion 8-9.
16. Cuoghi OA, Aiello CA, Consolaro A, Tondelli PM, Mendonça MR. Resorption of roots of different dimension induced by different types of forces. *Braz Oral Res* 2014;28:1-7.
17. Olson C, Uribe F, Kalajzic Z, Utreja A, Nanda R, Rowe D, Wadhwa S. Orthodontic tooth movement causes decreased promoter expression of collagen type I, bone sialoprotein and alpha-smooth muscle actin in the periodontal ligament. *Orthod Craniofac Res* 2012;15:52-61.
18. Cuoghi AO, Tondelli PM, Sonoda CK, Aiello CA, Mendonça MR, Costa SC. Induction of ankylosis in the incisor for orthodontic tooth movement in rats. *Dental Traumatology* 2014;30:112-117.
19. Gonzales C, Hotokezaka H, Yoshimatsu M, Yozgatian JH, Darendeliler MA, Yoshida N. Force magnitude and duration effects on amount of tooth movement and root resorption in the rat molar. *Angle Orthod* 2008;78:502-9.
20. Tanaka M, Ejiri S, Toyooka E, Kohno S, Ozawa H. Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone. *J Periodont Res* 2002;37:161-65.

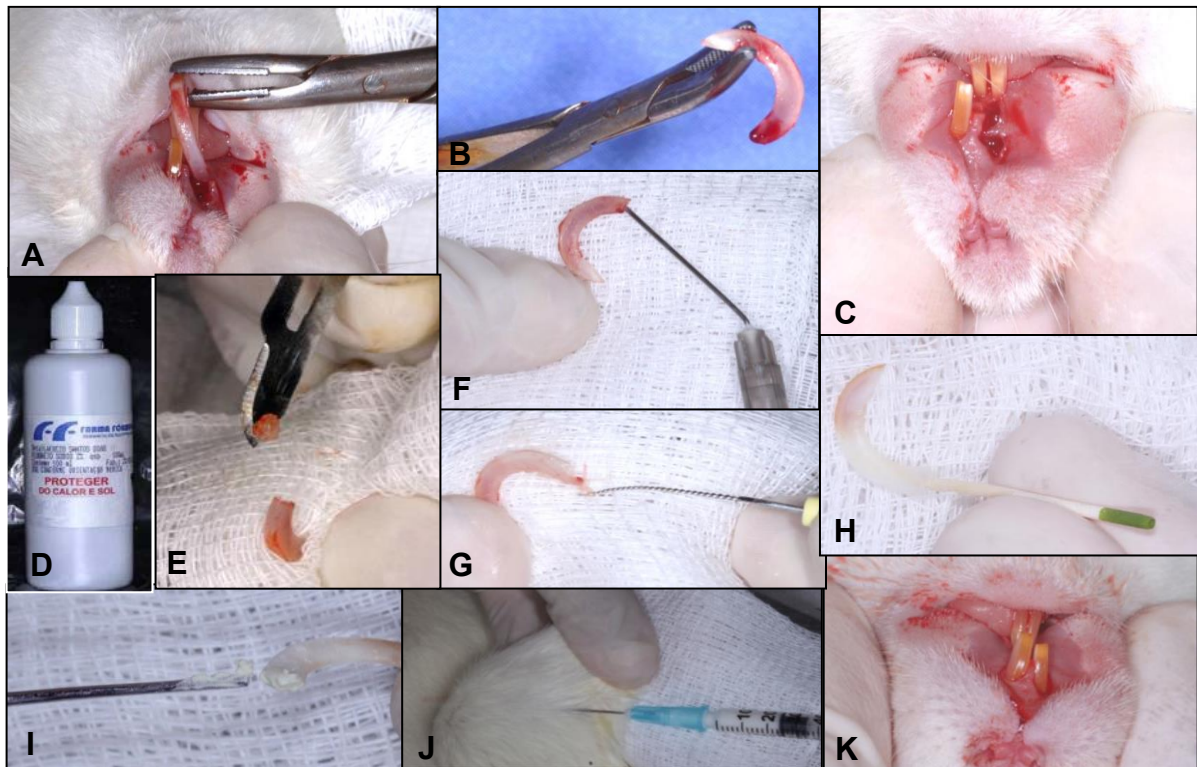
21. Cuttle L, Nataatmadja M, Fraser JF, Kempf M, Kimble RM, Hayes MT. Collagen in the scarless fetal skin wound: detection with picosirius-polarization. *Wound Repair Regen* 2005;13:198–204.
22. Salazar M, Hernandez L, Ramos AL, Salazar BO, Micheletti KR, Paranhos LR, Mendonça MR, Cuoghi OA. Effect of alendronate sodium on tooth movement in ovariectomized rats. *Arch Oral Biol* 2015;60:776-781.
23. Shitano C, Baba O, Kaneko S, Hosomichi J, Shimizu Y, Shibutani N, Usumi-Fujita R, Takano Y, Ono T. Alveolar bone loss induced by the orthodontic tooth movement under hypofunctional conditions in rats. *Orthodontic Waves* 2013;72:148-155.
24. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:457–75.
25. Tamatsu Y, Kaimoto K, Arai M, Ide Y. Properties of the elastic modulus from buccal compact bone of human mandible. *Bull Tokyo Dent Coll* 1996;37:93-10.
26. Tsuchiya S, Tsuchiya M, Nishioka T, Suzuki O, Sasano Y, Igarashi K. Physiological distal drift in rat molars contributes to acellular cementum formation *Anat Rec* 2013;296:1255–1263.
27. Kaley J, Phillips C. Factors related to root resorption in edgewise practice. *Angle Orthod* 1991;61(2):125-132.
28. Salazar M, Hernandez L, Ramos AL, Micheletti KR, Albino CC, Cuman RKN. Effect of teriparatide on induced tooth displacement in ovariectomized rats: a histomorphometric analysis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2011;139:e337-e344.
29. Murphy CA, Chandhoke T, Kalajzic Z, Flynn R, Utreja A, Wadhwa S, Nanda R, Uribe F. Effect of corticision and different force magnitudes on orthodontic tooth movement in a rat model. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2014;146:55-66.



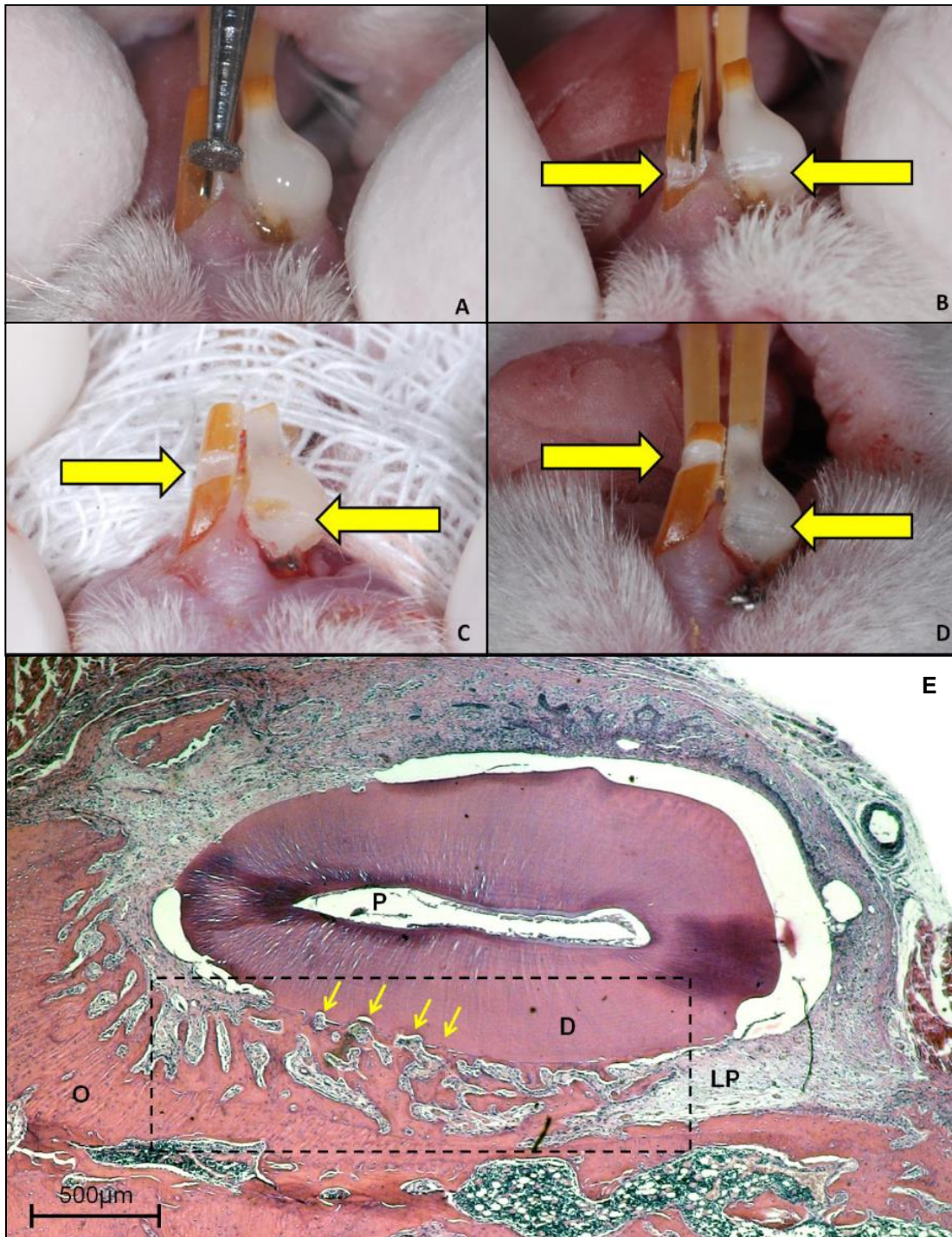
*Figuras*



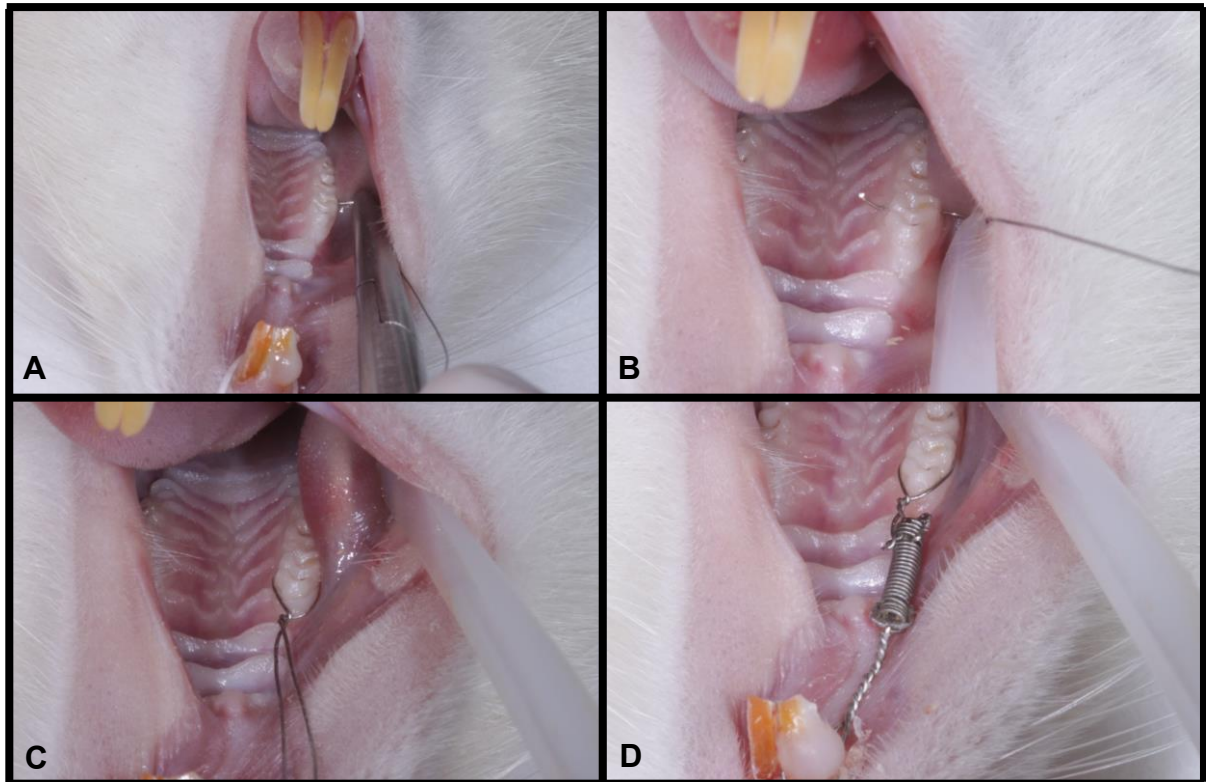
**Figura 1:** Grupos FC (Figura 1A), FCI (Figura 1B) e FI (Figura 1C) e suas subdivisões de acordo com o período total de movimentação, 5, 7 e 9 dias.



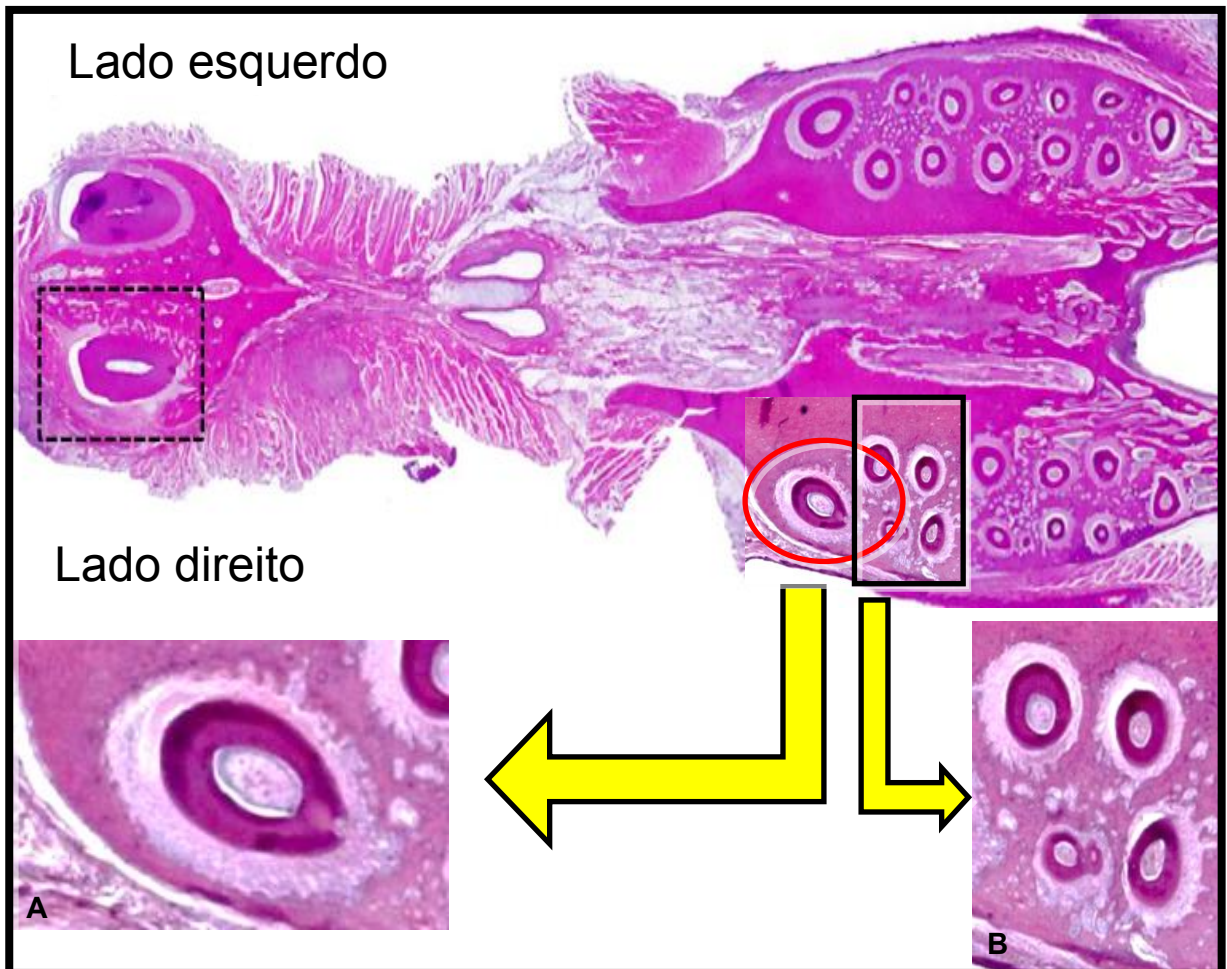
**Figura 2:** Procedimento de indução da anquilose do incisivo superior direito: (A e B) Exodontia; (C) Alvéolo; (D) Fluoreto de Sódio Fosfato Acidulado 2% usado para lavar o dente extraído; (E) Corte da papila dentária e órgão do esmalte; (F) Irrigação com soro; (G) Instrumentação do canal radicular; (H) Secagem do conduto radicular; (I) Preenchimento do canal radicular com pasta de hidróxido de cálcio e propileno glicol; (J) Aplicação de Penicilina G Benzatínica; (K) Reimplante dentário.



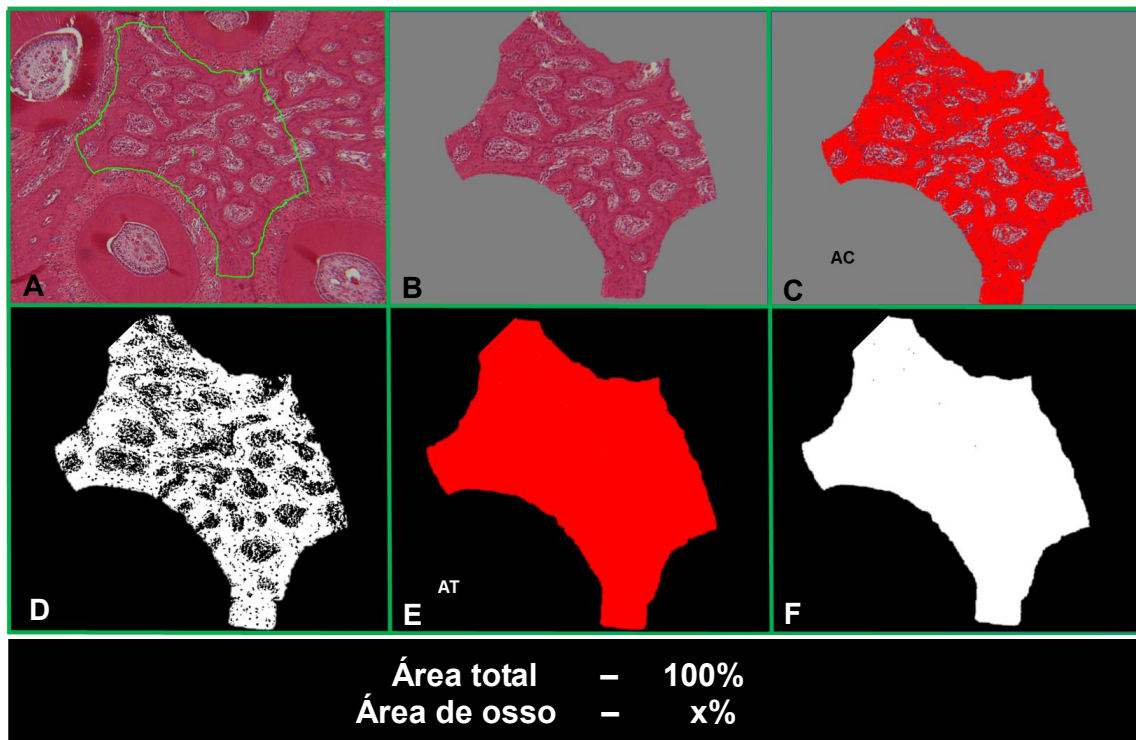
**Figura 3:** Determinação da anquilose do incisivo superior direito: (A e B) canaleta fabricada na resina colocada no incisivo direito e esquerdo; (C e D) comprovação da erupção ativa do incisivo esquerdo e ausência dela no incisivo direito; (E) Lâmina histológica comprovando a anquilose do incisivo direito (setas amarelas).



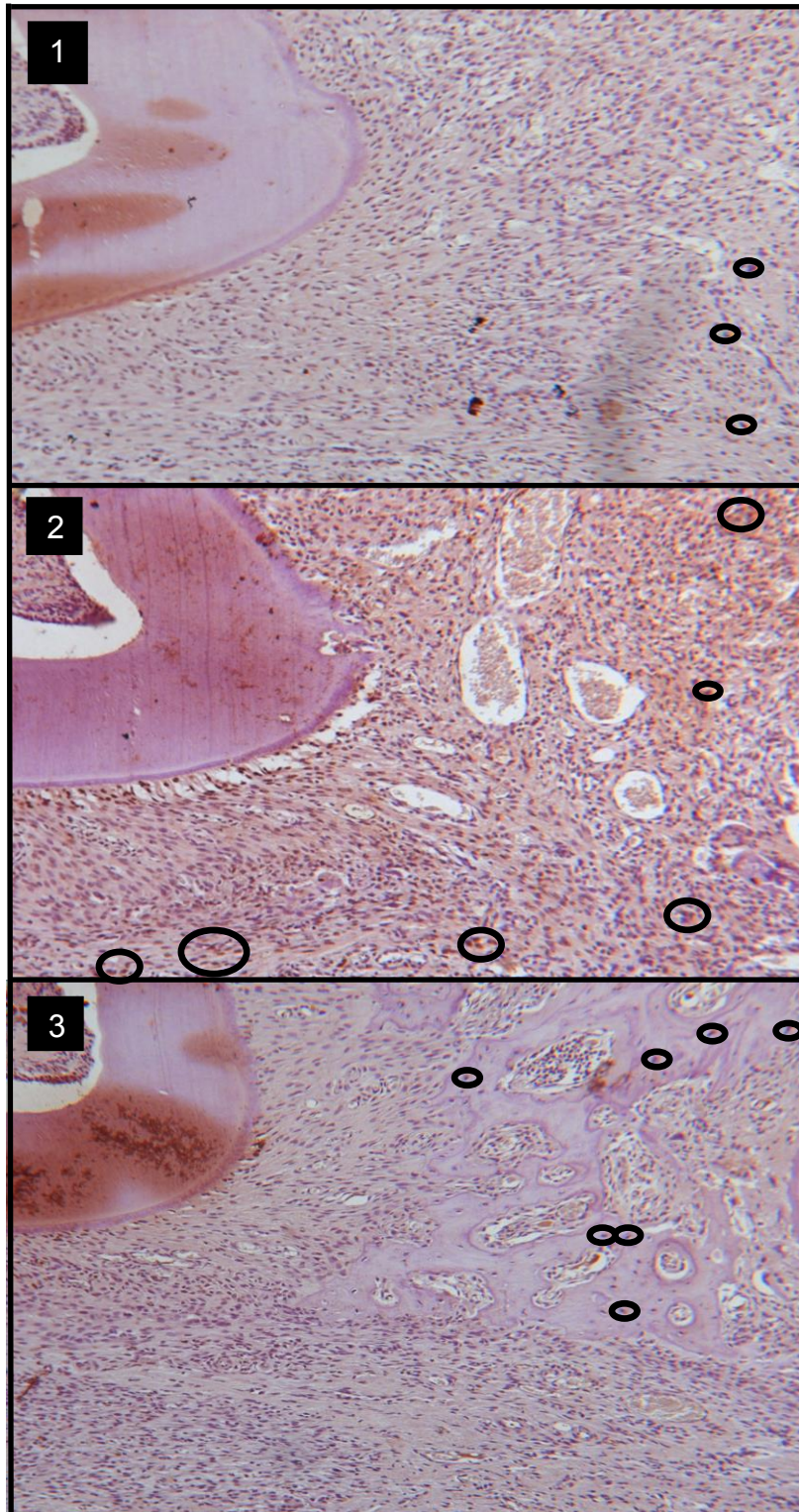
**Figura 4:** Instalação do dispositivo para MDI: (A) Posicionamento dito-vestibular do fio de amarrilho. (B) Fio de amarrilho inserido vestibulo-lingual abaixo do ponto de contato entre o primeiro e segundo molar; (C) Molar envolvido ao fio; (D) Inserção da mola de NiTi ancorada ao incisivo direito.



**Figura 5:** Estabelecimento das diretrizes para as análises histométricas: (A) Osso alveolar situado a mesial e a distal da raiz mesiovestibular do primeiro molar superior direito onde a análise Imunoistoquímica foi realizada; (B) Crista óssea alveolar situada entre as raízes médias e distais do primeiro molar superior direito onde a análise com HE foi realizada.

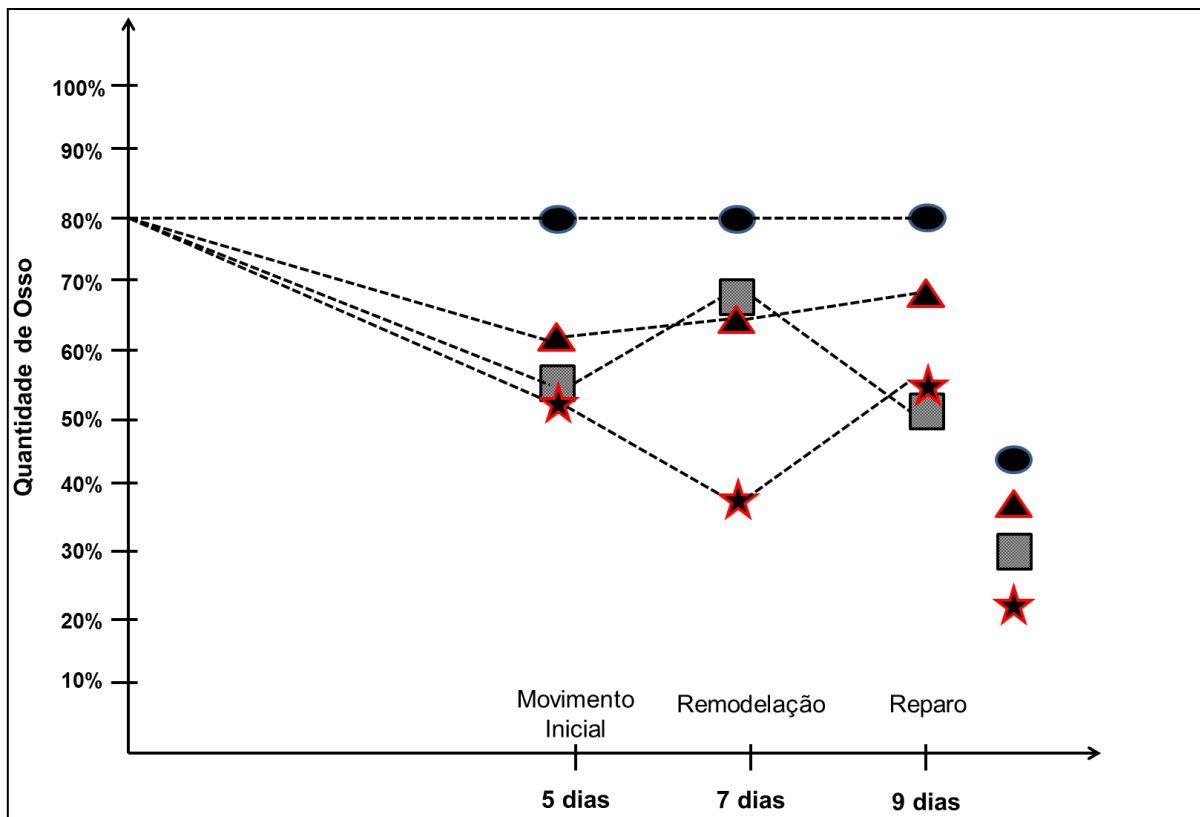


**Figura 6:** Técnica para delimitar a área ocupada por tecido ósseo na maxila (aumento de 10X); (A) Demarcação do osso alveolar na área interradicular tomando-se como ponto de referência o centro pulpar de cada uma das 4 raízes (distais e médias) do primeiro molar; (B) Extração do osso alveolar da região delimitada na figura 1B; (C) Toda a área rosa representa tecido ósseo corado de vermelho pelo programa Image Pro-plus®; (D) A área em branco corresponde a área ocupada por osso totalmente diferenciada para posterior quantificação ( $\mu\text{m}^2$ ); (E) Área total da região intraóssea corada em vermelho; (F) A área em branco corresponde a área total a ser quantificada ( $\mu\text{m}^2$ ).

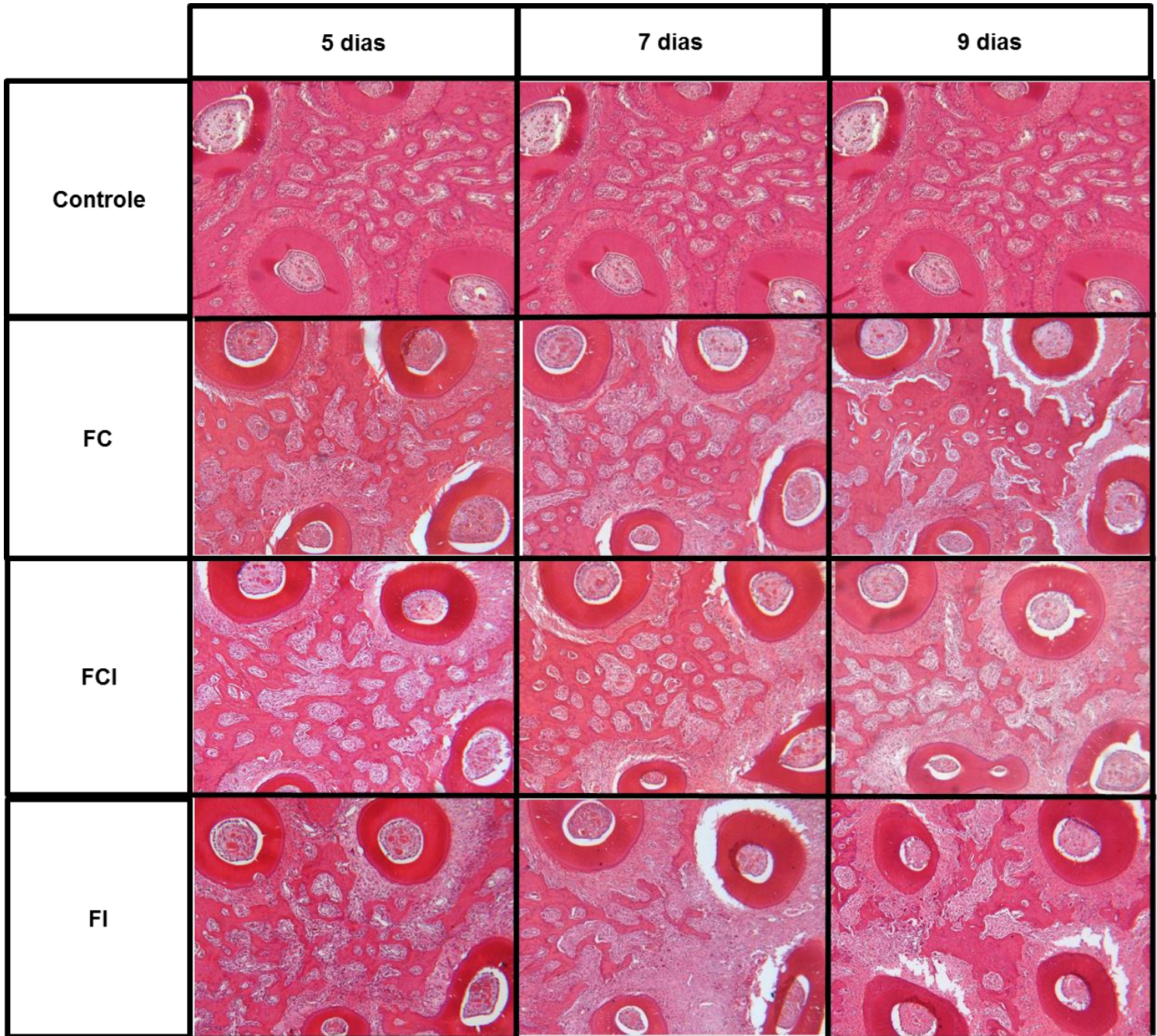


**Figura 7:** Padrão de distribuição da imunocoloração: (1) marcação fraca/difusa; (2) marcação moderada; e (3) marcação intensa.

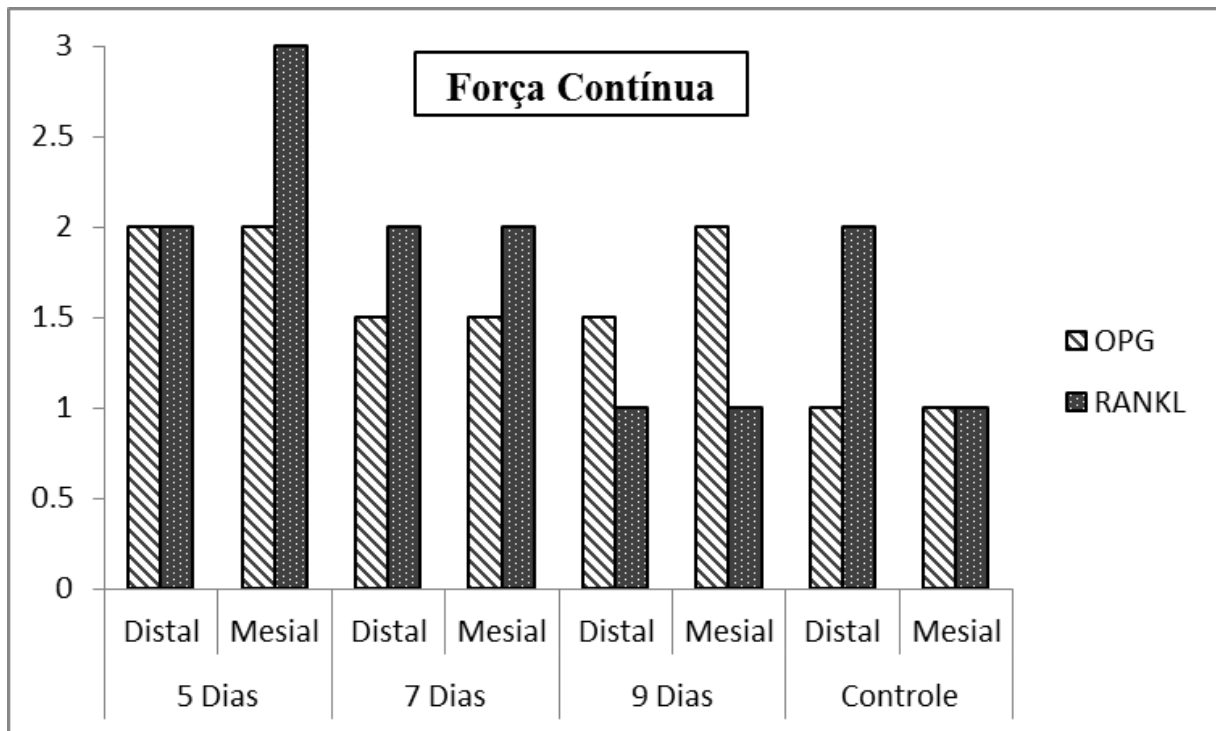




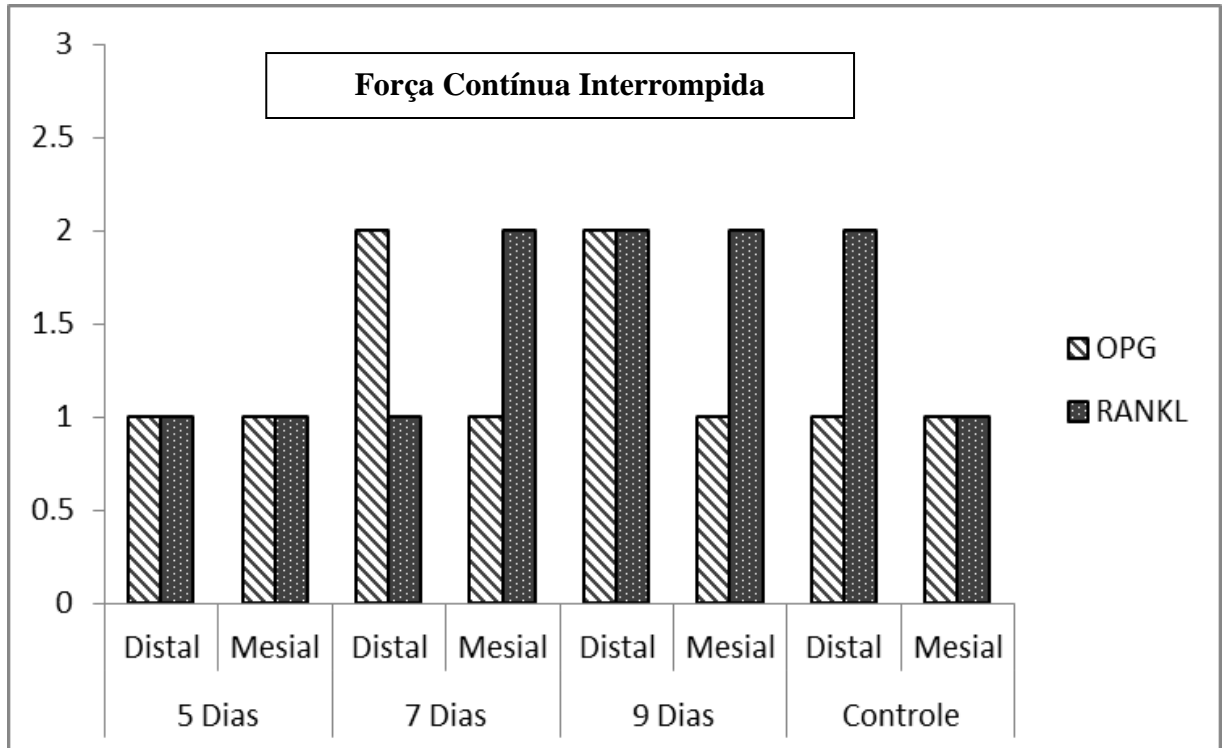
**Figura 8:** Análise da porcentagem de tecido ósseo localizado entre as raízes médias e distais do primeiro molar nos grupos Controle (C), força contínua (FC), força contínua interrompida (FCI) e força intermitente (FI) nos períodos de movimentação de 5, 7 e 9 dias: letras diferentes indicam diferença estaticamente significativa ( $p < 0,05$ ).



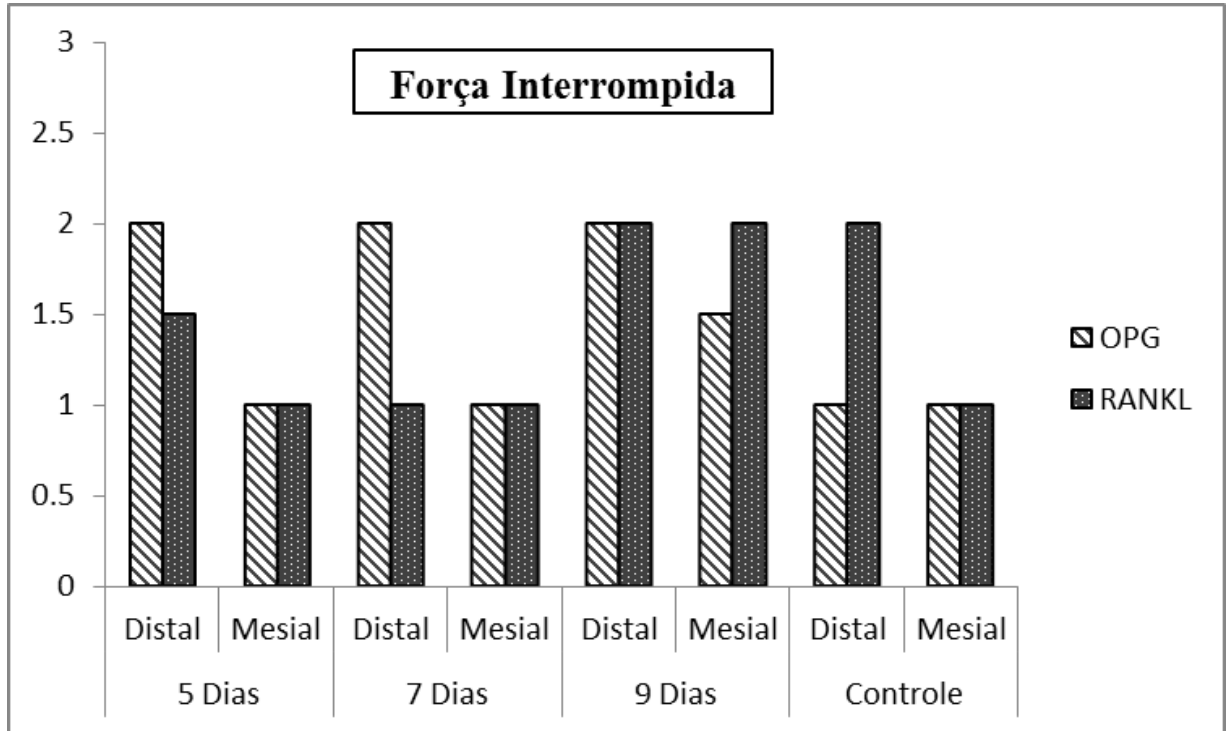
**Figura 9:** Fotomicrografia do tecido ósseo entre as raízes médias palatina dos grupos Controle, Força Contínua (FC), Força Contínua Interrompida (FCI) e Força Intermitente (FI) nos períodos experimentais de 5, 7 e 9 dias - aumento original 10X e coloração com Hematoxilina & Eosina.



**Figura 10:** Moda dos imunomarcadores OPG e RANKL no osso alveolar mesial e distal da raiz mesiovestibular do primeiro molar superior direito aos 5, 7 e 9 dias de MDI no grupo força contínua e grupo controle.



**Figura 11:** Moda dos imunomarcadores OPG e RANKL no osso alveolar mesial e distal da raiz mesiovestibular do primeiro molar superior direito aos 5, 7 e 9 dias de MDI no grupo força contínua interrompida e grupo controle.



**Figura 12:** Moda dos imunomarcadores OPG e RANKL no osso alveolar mesial e distal da raiz mesiovestibular do primeiro molar superior direito aos 5, 7 e 9 dias de MDI no grupo força intermitente e grupo controle.



*Tabelas*

**Tabela 1:** Comparação da área de tecido ósseo dos Grupos Controle (C), força contínua (FC), força contínua interrompida (FCI) e força intermitente (FI) aos 5, 7 e 9 dias: média (X) e desvio padrão (SD) - Anova e pós-teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

<b>5 Dias de Movimentação</b>				
<b>C</b>	<b>FC</b>	<b>FCI</b>	<b>FI</b>	
<b>X (SD)</b>	<b>X (SD)</b>	<b>X (SD)</b>	<b>X (SD)</b>	<b>P</b>
80% (0,01) <i>a</i>	62% (0,14) <i>b</i>	55% (0,07) <i>b</i>	54% (0,05) <i>b</i>	0,0003
<b>7 Dias de Movimentação</b>				
<b>C</b>	<b>FC</b>	<b>FCI</b>	<b>FI</b>	
<b>X (SD)</b>	<b>X (SD)</b>	<b>X (SD)</b>	<b>X (SD)</b>	<b>P</b>
80% (0,01) <i>a</i>	64% (0,1) <i>b</i>	68% (0,06) <i>ab</i>	38% (0,1) <i>c</i>	0,0001
<b>9 Dias de Movimentação</b>				
<b>Controle</b>	<b>FC</b>	<b>FCI</b>	<b>FI</b>	
<b>X (SD)</b>	<b>X (SD)</b>	<b>X (SD)</b>	<b>X (SD)</b>	<b>P</b>
80% (0,01) <i>a</i>	68% (0,03) <i>a</i>	51% (0,13) <i>b</i>	55% (0,11) <i>ab</i>	0,0001

\*Letras diferentes –  $p < 0.05$

**Tabela 2:** Evolução da área de tecido ósseo dos Grupos Controle (C), força contínua (FC), força contínua interrompida (FCI) e força intermitente (FI) durante os períodos experimentais: média (X) e desvio padrão (SD) - Anova e pós-teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

	<b>5 dias X (SD)</b>	<b>7 dias X (SD)</b>	<b>9 dias X (SD)</b>	<b>P</b>
<b>Controle</b>	80% (0,01) <i>a</i>	80% (0,01) <i>a</i>	80% (0,01) <i>a</i>	Ns
<b>FC</b>	62% (0,14) <i>a</i>	64% (0,1) <i>a</i>	68% (0,03) <i>a</i>	Ns
<b>FCI</b>	55% (0,07) <i>ab</i>	68% (0,06) <i>a</i>	51% (0,13) <i>b</i>	0.0162
<b>FI</b>	54% (0,05) <i>a</i>	38% (0,1) <i>b</i>	55% (0,11) <i>a</i>	0.0149

\*Letras diferentes –  $p < 0.05$ /ns – não significante estatisticamente.





## Anexo I



Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)  
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto "Remodelação óssea com as forças contínua, contínua interrompida e intermitente: movimentação dentária induzida em ratos" sob responsabilidade do Pesquisador **OSMAR APARECIDO CUOGHI** e colaboração de Kelly Regina Micheletti está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o protocolo **2012-01092**.

**CERTIFICATE**

We certify that the research "Bone remodeling with the continuous, continuously interrupted and intermittent forces: induced tooth movement in rats", protocol number **2012-01092**, under responsibility of **OSMAR APARECIDO CUOGHI** and with collaboration of Kelly Regina Micheletti agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.

**Prof. Dr. Edison Ervolino**  
CEUA Vice-Coordenador

## **Anexo II**

### **\*Normas American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**

#### **Double-blind review**

This journal uses double-blind review, which means that both the reviewer and author name(s) are not allowed to be revealed to one another for a manuscript under review. The identities of the authors are concealed from the reviewers, and vice versa. To facilitate this, please include the following separately:

*Title page (with author details):* This should include the title, authors' names and affiliations, and a complete address for the corresponding author including an e-mail address.

*Blinded manuscript (no author details):* The main body of the paper (including the references, figures, tables and any Acknowledgements) should not include any identifying information, such as the authors' names or affiliations.

#### **Article structure**

##### *Introduction*

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

##### *Material and Methods*

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

##### *Results*

Results should be clear and concise.

##### *Discussion*

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

##### *Conclusions*

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

#### **Essential title page information**

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

### **Abstract**

A structured abstract using the headings Introduction, Methods, Results, and Conclusions is required for Original Article, Systematic Review, Randomized Controlled Trial, and Techno Bytes. An unstructured abstract is acceptable for Case Report and Clinician's Corner.

### **Graphical abstract**

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

### **Highlights**

Highlights are a short collection of bullet points that convey the core findings of the article. Highlights are optional and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

## **Acknowledgments**

Collate acknowledgments in a separate section at the end of the article before the references; do not include them on the title page, as a footnote to the title page, or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (eg, providing help with language or writing assistance, or proofreading the article).

## **Artwork**

### *Image manipulation*

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

### *Electronic artwork*

#### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts. TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

**Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

*Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. For further information on the preparation of electronic artwork.

*Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

**Tables**

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

**References**

*Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

*Reference links*

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

#### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

#### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

#### *Reference style*

*Text:* Indicate references by superscript numbers in the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

*List:* Number the references in the list in the order in which they appear in the text.

#### *Examples:*

Reference to a journal publication:

1. Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *Sci Commun* 2010;16351-9.

Reference to a book:

2. Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000. Reference to a chapter in an edited book:

3. Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*. New York: E-Publishing Inc; 2009. p. 281-304. Note shortened form for last page number. e.g., 51-9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;**277**:927–34)

#### **Video data**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be

placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **Supplementary material**

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction.

### **3D Models**

You can enrich your online articles by providing 3D models (optional) in PLY, OBJ or U3D format, which will be visualized using the interactive viewer next to the article. Each 3D model will have to be zipped and uploaded to online submission system via the "3D models" submission category. Please be advised that the recommended model size before zipping is 50-100 MB. Multiple models can be submitted. Please provide a short informative description for each model by filling in the "Description" field when uploading a dataset. Note: all datasets will be available for download from the online article on ScienceDirect. If you have concerns about your data being downloadable, please provide a video instead.

### **Submission Checklist**

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers



All necessary files have been uploaded, and contain:

- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources

### **Permissions**

To use information borrowed or adapted from another source, authors must obtain permission from the copyright holder (usually the publisher). This is necessary even if you are the author of the borrowed material. It is essential to begin the process of obtaining permissions early; a delay may require removing the copyrighted material from the article. Give the source of a borrowed table in a footnote to the table; give the source of a borrowed figure in the legend of the figure. The source must also appear in the list of references. Use exact wording required by the copyright holder. To secure permission for materials published in *AJO-DO*. For more information about permission issues, contact [permissionshelpdesk@elsevier.com](mailto:permissionshelpdesk@elsevier.com)

### **Use of the Digital Object Identifier**

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

### **Proofs**

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 9 (or higher) available free. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please

list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

**Offprints**

For a fee, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop. Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover.

**Offprints**

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop. Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover.

### Anexo III

## ANÁLISE DA MATRIZ ORGÂNICA

### 5 DIAS

	Com mov	% Matriz	Contra-lateral	% Matriz
Rato 1 p	204671.3	42.30%	302085.13	68.70%
Rato 1 t	483286.2		439550.16	
Rato 2 p	169908.3	45.60%	217712.8	75.60%
Rato 2 t	372349.5		288061.25	
Rato 3 p	228242.9	60.70%	410527.69	75%
Rato 3 t	375818.3		547526.31	
Rato 4 p	249550	73.00%	260022	73.00%
Rato 4 t	342478		355379	
Rato 5 p	358771	82.90%	317823.88	83.30%
Rato 5 t	474834		381571.97	
Rato 6 p	267342.9	68.60%	338310	77%
Rato 6 t	389568.2		440191	
X		62.18%		75.43%
SD		15.87%		4.39%

### 7 DIAS

	Com mov	% Matriz	Contra-lateral	% Matriz
Rato 1 p	311861.9	75.38%	253134.59	61.47%
Rato 1 t	413704.5		411770.25	
Rato 2 p	353177.5	73.70%	376220.41	81.07%
Rato 2 t	479197.2		464052.25	
Rato 3 p	238556.8	62.73%	310703.81	67.96%
Rato 3 t	380262.6		457216.25	
Rato 4 p	275355	68.71%	270098.59	60.97%
Rato 4 t	400768.5		442993.78	
Rato 5 p	212744.6	46.37%	277061.94	60.83%
Rato 5 t	458838.1		455461.25	
Rato 6 p	269331.5	55.31%	304792.75	62.02%
Rato 6 t	486968.2		491452.25	

X	63.70%	65.72%
SD	10.27%	7.29%

**9 DIAS**

	Com mov	% Matriz	Contra-lateral	% Matriz
Rato 1 p	296594.8	66.24%	364325.94	78.08%
Rato 1 t	447741.2		466605.53	
Rato 2 p	222264.4	63.49%	322016.94	82.76%
Rato 2 t	350097.9		389077.16	
Rato 3 p	248471.3	68.45%	423279.59	80.85%
Rato 3 t	362980.3		523516.25	
Rato 4 p	313297.6	72.61%	343049.13	77.36%
Rato 4 t	431469.5		443444.28	
Rato 5 p	269347	64.31%	254789.97	60%
Rato 5 t	418812.8		425364.69	
Rato 6 p	315533.6	71.98%	383060.19	79.20%
Rato 6 t	438369.5		483637.72	

X	67.85%	76.38%
SD	3.52%	7.54%