

Priscilla Cunha Santos Andrade

*Avaliação das Áreas Hialinas
Decorrentes da Movimentação
Dentária Induzida*

ARAÇATUBA - SP

2016

Priscilla Cunha Santos Andrade

**Avaliação das Áreas Hialinas Decorrentes
da Movimentação Dentária Induzida**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Unesp, para a obtenção do grau de “Mestre em Odontologia”- Área de Concentração Ortodontia.

Orientador: Prof. Adj. Dr. Marcos Rogério de Mendonça

Co-orientador: Prof. Adj. Dr. Marcelo Macedo Crivelini

ARAÇATUBA - SP

2016

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

A553a Andrade, Priscilla Cunha Santos.
Avaliação das áreas hialinas decorrentes da movimentação dentária induzida / Priscilla Cunha Santos Andrade. – Araçatuba, 2016
63 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Marcos Rogério de Mendonça
Coorientador: Prof. Marcelo Macedo Crivelini

1. Movimentação dentária 2. Hialina 3. Ratos I. T.

Black D4
CDD 617.643

Dedicatória

Aos meus pais, Wilton e Sílvia.

Pais, vocês são os responsáveis por me fazer acreditar que pela educação o ser humano pode atingir sua dignidade e consciência. Que toda realidade social pode ser mudada e melhorada pela busca do conhecimento e do nosso papel na sociedade.

Ao meu esposo, Luís Otávio.

Meu amor, Luís Otávio, esses anos não foram fáceis para nós, mas você foi o meu grande incentivador. Acreditou em mim. Esta conquista também é sua.

Agradecimentos

Hoje sei que sozinhos não podemos alcançar nossos objetivos, precisamos de Deus e precisamos das pessoas. Por isso quero deixar meu agradecimento a todos que contribuíram de alguma forma.

Primeiramente agradeço a **Deus**. Sempre entregue em suas mãos fui guiada por este caminho. Não sei os frutos que nascerão a partir daqui, mas sei que estou no lugar certo e na hora certa. Obrigada meu Deus pelos momentos de silêncio ao seu lado, longe da família, marido e amigos sua presença se fez ainda mais forte. Grandes encontros eu tive contigo durante esses dois anos. Tenho a certeza que se hoje comemoro esta conquista, foi porque a sua mão me sustentou, me deu força, coragem e motivos para seguir adiante.

Ao meu esposo **Luís Otávio**, por me apoiar incondicionalmente, sem você não seria possível esta conquista. Obrigada por não me deixar abalar, por sempre me mostrar que tudo passa e depois vem o sol. Sempre me incentivou frente aos desafios, compreendeu as minhas ausências e me consolou nos momentos difíceis. Amo-te muito.

Obrigada **Pai e Mãe**, pela educação e amor que me deram, por todo apoio durante este tempo, pelas orações e preocupações comigo. Vocês são minha base, meus alicerces. Sei que sempre posso contar com vocês.

À minha irmã **Patrícia** e ao meu sobrinho **Fernando** por entenderem minha ausência.

Aos meus sogros, **Maria Ofélia e Ivo** pelo apoio e consideração. Aos meus cunhados **Mara Elisa, André** e cônjuges pelo incentivo.

À toda **minha família, avós, tios (a), primos (a)**, pela torcida, apoio nesta caminhada e pelas orações de vocês.

Ao Professor **Marcos Rogério de Mendonça, meu orientador**, por me aceitar como sua aluna, por ter me dado a chance de crescimento pessoal e profissional. Obrigada professor pelo acolhimento, pelos momentos de aprendizagem científica e humanística, por me fazer ter um olhar crítico, por me despertar para a ciência, por compreender os meus erros e acertos, pelos conselhos. Sua paixão por ensinar salta aos olhos. A arte de ensinar você faz sempre com prazer.

Ao professor **Marcelo Macedo Crivellini, meu coorientador**, pelo auxílio científico no desenvolvimento deste trabalho, pela disponibilidade em ajudar, por ceder infraestrutura laboratorial para o desenvolvimento da pesquisa. Sua ajuda foi de excepcional importância.

Ao professor **Osmar Aparecido Cuoghi** pelos ensinamentos profissionais e pessoais. Por me permitir aprender com sua experiência clínica e de professor-pesquisador.

Aos professores **André Bertoz e Renato Bigliuzzi** pela amizade e oportunidade de aprendizado e convívio no departamento de ortodontia.

Ao professor **Mauro Agner Busato** por aceitar o convite em compor a banca da minha dissertação.

Ao professor **Edilson Ervolino** que com disponibilidade participou do meu exame geral de qualificação.

À professora **Leda Maria Pescinini Salzedas** por ajudar sempre com boa vontade no departamento de radiologia.

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba–Unesp** pela oportunidade de formação e crescimento científico-profissional.

Aos amigos veteranos **Kelly Micheletti, Yesselin Miranda, Éverton Lelis, Ana Caroline Verri, Aubrey Fabre**, por me acolherem e sempre estarem disponíveis para qualquer ajuda necessária. Às amigas de curso **Luciana Artioli, Lorraine Faria e Francielle Topolski** pelo convívio e momentos alegres. A presença de vocês tornou mais feliz os meus dias aqui. À **Camila Ferlin** minha companheira de todas as horas, sem sua ajuda seria muito difícil concluir esta etapa. Obrigada pela companhia, pelo belo trabalho que desenvolvemos juntas, pela amizade, por me ajudar inúmeras vezes! Você foi uma grande amiga. Desejo o sucesso de todos vocês!

À minha amiga **Vívian** pelo acolhimento em sua casa e apoio durante todo este tempo.

Às amigas de Belo Horizonte, **Camila, Clarissa, Nanda, Luciana, Fernanda, Joanna, Stela, Patrícia**, aos amigos e professores da turma de especialização em Ortodontia da ABO-MG **Rodolfo, Daniel, Edwin, Marina, Marininha, Simone, Gabriela, Graziela, Lívia, Adauto, Gisele, Verinha, Zezé, Alexandre**, aos amigos cirurgiões-dentistas **Bárbara Gorgoni, Júlio Tanos Lacerda, Yolenita Guedes, Carla Dias, Andreia Sousa** que mesmo longe torceram pelo meu sucesso.

Aos funcionários do departamento de Ortodontia: **Ilídio, Bertolina, Luizinho** pelo sorriso no rosto que nos recebe em cada dia e pelo trabalho essencial que desempenham no departamento.

Aos funcionários do biotério: **Camilo, Alan, João** que nos acolheram e ajudaram durante a pesquisa. Obrigada por abrir as portas e permitir o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos funcionários do laboratório de patologia **Giseli Mitsuy Kayahara e José Marcelo Tramarim (Marcelinho)** pela disponibilidade em ensinar e ajudar.

Às funcionárias da secretaria da pós-graduação: **Lilian, Cristiane e Valéria** pela paciência com minhas dúvidas.

Aos **alunos da graduação** e **aos pacientes** da disciplina de Ortodontia pela possibilidade de aprendizado.

Buscar um sonho...sair da zona de conforto e buscar crescer e aprender. Almejar novos horizontes, se encontrar. Nada é impossível quando colocamos fé naquilo que desejamos. Foi com muita luta, mas cheguei!

Epígrafe

Caçador de Mim

*“Por tanto amor, por tanta emoção
A vida me fez assim
Doce ou atroz, manso ou feroz
Eu, caçador de mim
Preso a canções
Entregue a paixões que nunca tiveram fim
Vou me encontrar longe do meu lugar
Eu, caçador de mim
Nada a temer
Senão o correr da luta
Nada a fazer
Senão esquecer o medo
Abrir o peito à força
Numa procura
Fugir às armadilhas da mata escura
Longe se vai sonhando demais
Mas onde se chega assim
Vou descobrir o que me faz sentir
Eu, caçador de mim ”*

Sérgio Magrão e Luiz Carlos Sá

Andrade PCS. Avaliação das áreas hialinas decorrentes da movimentação dentária induzida [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Faculdade de Odontologia de Araçatuba; 2016.

Resumo

Objetivo: Avaliar a formação das áreas hialinas (AH) e a quantidade de movimentação dentária induzida (MDI), no ligamento periodontal, decorrentes da aplicação de força ortodôntica no modelo experimental utilizando-se molares de ratos. **Materiais e métodos:** Foram utilizados 70 ratos Wistar que foram divididos em 7 grupos (n=10), um grupo controle (GC) e seis grupos experimentais (GM1, GM3, GM5, GM7, GM14 e GM21) em que o primeiro molar superior direito foi movimentado com uma mola de níquel-titânio, com força contínua de 50 cN, durante 1, 3, 5, 7, 14 e 21 dias respectivamente. Foi realizada análise histopatológica e semi-quantitativa das AH (Kruskal Wallis–Dunn, $p < 0.05$) e uma análise quantitativa da MDI (Anova-Holm Sidak, $p < 0.05$). **Resultados:** Houve aumento estatisticamente significante das AH no GM3 comparado ao GC, GM14 e GM21. Na avaliação da quantidade de MDI foram detectadas diferenças estatisticamente significantes entre o GC e os demais grupos experimentais, entre GM1xGM7, GM14xGM1, 3, 5 e entre GM21xGM1, 3, 5, 7. Para as demais comparações não houve diferenças estatisticamente significantes. **Conclusão:** A MDI apresentou restrição nos períodos iniciais (1-5 dias) e uma aceleração nos dias subsequentes (7-21 dias). As AH apresentaram seu pico de formação aos 3 dias de MDI, sendo este o melhor período para sua observação.

Palavras-chave: Movimentação Dentária; Hialina; Ratos.

Andrade PCS. Evaluation of hyaline areas caused by induced tooth movement [dissertation]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, Dental School of Araçatuba; 2016.

Abstract

Objective: To evaluate the formation of hyaline areas (HA) and the rate of induced tooth movement (ITM) derived from the application of orthodontic force in an experimental model using rat molars. **Methods:** 70 Wistar rats were divided into 7 groups (n = 10), a control group (CG) and six experimental groups (GM1, GM3, GM5, GM7, GM14 and GM21) in which upper right first molar was moved by means of nickel-titanium spring, with continuous force of 50 cN for 1, 3, 5, 7, 14 and 21 days respectively. Histopatological and semi-quantitative analysis of the HA (Kruskal Wallis–Dunn, $p < 0.05$) and a quantitative analysis of ITM rate was conducted (Anova-Holm Sidak, $p < 0.05$). **Results:** There was a statistically significant increase of HA in the GM3 compared to GC, GM14 and GM21. In assessing the amount of ITM, statistically significant differences were found among GC and all experimental groups, among GM1xGM7, GM14xGM1, 3, 5 and GM21xGM1, 3, 5, 7. **Conclusion:** The observed ITM showed restrain in early periods (1-5 days) and an increasing acceleration in subsequent days (7-21 days). The HA peaked formation at 3 days of ITM, which is the best time for its observation.

Keywords: Tooth Movement; Hyalin; Rats.

Lista de Figuras

Figura 1 - Dispositivo instalado para MDI.....	47
Figura 2 - Fotomicrografia utilizada para cálculo quantitativo da movimentação dentária induzida. Primeiro molar superior direito (1 ^o MSD), segundo molar superior direito (2 ^o MSD), tangente 1 (T1), tangente 2 (T2), distância avaliada (d- linha vermelha)	47
Figura 3 - Representação da metodologia visual utilizada na análise de escores das AH. Sentido da força (seta vermelha), área avaliada (retângulo vermelho), ausência de AH (Escore 1), até 25% de AH (escore 2), de 25% a 50% de AH (escore 3), de 50% a 75% de AH (escore 4), mais de 75% de AH (escore 5), tangente superior (T3), tangente inferior (T4), comprimento do ligamento periodontal (CLP).....	48
Figura 4 - Gráfico 1 - Média, desvio-padrão e diferença estatística para quantidade de movimentação dentária induzida por grupo (teste Anova - Holm Sidak, $p < 0.05$).....	49
Figura 5 - Grupo GM1 - periodonto da face mesial da RDV: (a) terço cervical exibindo reabsorção óssea e infiltrado inflamatório moderado; (b) terço médio evidenciando compressão e AH em desenvolvimento (seta); (c) terço apical com periodonto comprimido.....	49
Figura 6 - Grupo GM3 - periodonto da face mesial da RDV: (a) terço cervical exibindo reabsorção óssea à distância, infiltrado inflamatório moderado, AH (seta) e hiperemia; (b) terço médio e (c) terço apical evidenciando compressão do LP, AH (setas) e reabsorção óssea à distância.....	50
Figura 7 - Grupo GM5 - periodonto da face mesial da RDV: (a) terço cervical exibindo início de reabsorção radicular (seta) e perda óssea; (b) terço médio e (c) terço apical exibindo LP com aspecto de normalidade e presença de células gigantes multinucleadas.....	50

Figura 8 - Grupo GM7 - periodonto da face mesial da RDV: (a) terço cervical exibindo reabsorção radicular, AH (seta); (b) terço médio evidenciando compressão do LP e AH (seta); (c) terço apical com periodonto exibindo aspecto próximo a normalidade.....	51
Figura 9 - Grupo GM14 - periodonto da face mesial da RDV: (a) terço cervical e (b) terço médio exibindo reabsorção radicular (seta); (c) terço apical com periodonto exibindo normalidade e linhas de reversão no tecido ósseo (seta).....	51
Figura 10 - Grupo GM21 - periodonto da face mesial da RDV: (a) terço cervical exibindo reabsorção radicular (seta); (b) terço médio com periodonto exibindo normalidade e reabsorção radicular (seta); (c) terço apical exibindo linhas de reversão no osso alveolar.....	52
Figura 11 - Gráfico 2 - Porcentagem e diferença estatística para análise de escores das AH por grupo (Kruskal Wallis - Dunn $p < 0.05$).....	52

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Média e desvio-padrão (DP) da quantidade de MDI por grupo em unidades de micrometros (μm).....	53
Tabela 2 - Análise estatística de comparação entre os grupos para a quantidade de MDI (Teste Anova – Holm Sidak, $p < 0.05$).....	54
Tabela 3 - Resultado do teste estatístico de Kruskal Wallis - Dunn para as comparações entre os grupos com base na análise de escores das AH ($p < 0.05$).....	55

Lista de Abreviaturas

1° MSD = Primeiro molar superior direito

2° MSD = Segundo molar superior direito

µm- Micrometros

AH = Área(s) hialina(s)

AHd = Área(s) hialina(s) em desenvolvimento

O = Osso alveolar

CLP = Comprimento do ligamento periodontal

cN = Centinewton

D = Dentina

FOA-UNESP = Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

GC = Grupo controle

GM1 = Grupo movimentação dentária induzida 1 dia

GM3 = Grupo movimentação dentária induzida 3 dias

GM5 = Grupo movimentação dentária induzida 5 dias

GM7 = Grupo movimentação dentária induzida 7 dias

GM14 = Grupo movimentação dentária induzida 14 dias

GM21 = Grupo movimentação dentária induzida 21 dias

LP = Ligamento periodontal

MDI = Movimentação dentária induzida

P = Polpa

RDV = Raiz disto - vestibular

T1 = Tangente 1

T2 = Tangente 2

T3 = Tangente 3

T4 = Tangente 4

Sumário

1 Introdução.....	17
2 Proposição.....	20
3 Materiais e Métodos.....	22
4 Resultados.....	30
5 Discussão.....	36
6 Conclusão.....	41
Referências.....	43
Figuras.....	47
Tabelas.....	53
Anexos.....	56

Introdução

1 Introdução*

Na ciência ortodôntica busca-se constantemente pelo conhecimento da movimentação dentária induzida (MDI) ideal. Entende-se por MDI ideal aquela que é capaz de deslocar o dente eficientemente, com o mínimo de dano tecidual às estruturas envolvidas (ligamento periodontal (LP), osso alveolar (O), raiz) e mínimo desconforto ao paciente.¹ Dentre os danos teciduais indesejáveis que ocorrem durante a MDI está a formação de áreas hialinas (AH) no LP. As AH são caracterizadas como sendo necroses de coagulação, causadas por compressão mecânica do LP, com morte celular devido à hipóxia no tecido. Pode ocorrer conseqüentemente reabsorção óssea à distância e reabsorção radicular, o que geralmente está associado à aplicação de forças intensas.^{2,3}

Embora os princípios biológicos e fisiológicos da MDI sejam relatados desde o princípio do século XX, estes ainda não são totalmente conhecidos,⁴ destacando-se entre eles o fenômeno da hialinização no LP. Uma revisão sistemática foi publicada em 2009,⁵ com o objetivo de explorar toda a literatura pertinente ao assunto. Os autores concluíram que embora a hialinização seja considerada um efeito colateral da movimentação ortodôntica com sérios agravantes, pouca atenção tem sido dada para este fenômeno, e existe portanto necessidade de mais estudos para esclarecer melhor o papel das AH na MDI.⁵

O modelo experimental com ratos é o mais utilizado e já consagrado na literatura como um modelo adequado para o estudo da MDI.^{4,6} Entretanto, ao

* De acordo com as normas do periódico The Angle Orthodontist (Anexo A).

avaliar os estudos que utilizaram o modelo experimental de MDI em molares de ratos, verifica-se uma variedade de maneiras pelas quais os autores apresentam seus resultados, com pouca padronização.⁵ Comparações entre estudos que analisaram as AH se tornam difíceis de realizar uma vez que existe uma variabilidade de metodologias o que incluiu diferentes tipos de força, dispositivos, amostras, tempo experimental, destacando aqui poucas metodologias para qualificar/quantificar as AH. Até o momento, poucos estudos priorizaram análises com critérios específicos e reprodutíveis de avaliação histológica. Vários estudos foram realizados com o objetivo de analisar as respostas biológicas frente a aplicação de forças, porém muitas perguntas permanecem com respostas incompletas. O momento em que as áreas de hialinização ocorrem, bem como sua extensão em relação aos períodos iniciais da aplicação de forças, representa uma questão ainda perene de estar totalmente resolvida.

Dessa forma, é importante conhecer, no modelo experimental, o padrão de formação das AH, através de metodologias bem estabelecidas, com o intuito de que protocolos de tratamentos possam ser testados a fim de evitar ou diminuir os efeitos colaterais e mais especificamente a formação das AH.

Proposição

2 Proposição

O objetivo desse estudo foi avaliar a formação das AH e a quantidade de MDI decorrentes da aplicação de uma força sobre molares de ratos.

Materiais e Métodos

3 Materiais e Métodos

3.1 Comitê de ética

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (FOA-UNESP) (Número do protocolo 2014-00813/2014-00814) - (Anexo B).

3.2 Amostra

Foram utilizados 70 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), adultos jovens, todos com 45 dias de idade e peso entre 230 a 250g ao início dos procedimentos, todos originários do biotério central da FOA-UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas em condições climáticas controladas com ciclo de luz de 12/12 horas e temperatura constante, sendo alimentados com ração sólida (Ração Ativada Produtor®; Anderson & Clayton S.A. Indústria e Comércio, São Paulo, SP, Brasil) e água *ad libitum*.

3.3 Formação dos grupos

Os animais foram divididos em sete grupos com 10 animais cada, aleatoriamente, conforme descrito abaixo (Anexo C):

Grupo GC: Composto por animais que não foram submetidos a nenhum procedimento, servindo como controle para os demais grupos.

Grupo GM1: Animais submetidos à MDI por 1 dia.

Grupo GM3: Animais submetidos à MDI por 3 dias.

Grupo GM5: Animais submetidos à MDI por 5 dias.

Grupo GM7: Animais submetidos à MDI por 7 dias.

Grupo GM14: Animais submetidos à MDI por 14 dias.

Grupo GM21: Animais submetidos à MDI por 21 dias.

3.4 Sedação dos animais

Os procedimentos experimentais foram realizados sob anestesia geral, por meio da aplicação de um relaxante muscular Cloridrato de Xilazina (DOPASER, Caleir S.A., Barcelona, Espanha) ministrando-se 0,03ml/100g de peso e, em seguida, anestésico Cloridrato de Cetamina (VETASET, Fort Dodge Animal Health, Iowa, USA) com dosagem de 0,07ml/100g de peso, ambos por via intramuscular.

3.5 Instalação do dispositivo para movimentação dentária induzida

Após a anestesia, a assepsia da região foi realizada com iodopovidona a 1% (Riodeine®; Indústria Farmacêutica Rioquímica Ltda., São José do Rio Preto, SP, Brasil). Os animais dos grupos GM1, 3, 5, 7, 14 e 21 foram submetidos à MDI sobre o primeiro molar superior direito (1°MSD), sendo realizado por um único operador. O dispositivo empregado neste estudo é uma

modificação do proposto por Heller e Nanda em 1979⁷ e os períodos de MDI analisados foram de 1, 3, 5, 7, 14 e 21 dias, semelhante a outro estudo.⁵ Este dispositivo modificado foi constituído de uma mola de níquel-titânio (Sentalloy®, GAC, NY, EUA), de secção fechada, com liberação de 50 cN de magnitude de força constante. A magnitude da força da mola foi verificada previamente por meio de um tensiômetro (Zeusan Exporting Ltda Campinas, São Paulo, Brasil). Além disso, dois segmentos de fio de amarelo, com espessura de 0,25 mm (Morelli, Sorocaba, SP, Brasil) foram conectados em cada extremidade da mola, um contornando o 1ºMSD e o outro segmento o incisivo central superior direito (ICSD) do animal. Para a estabilidade do fio de amarelo, na face vestibular do ICSD, realizou-se uma canaleta na região cervical e um travamento com resina composta fotopolimerizável (Amelogen® Plus, Ultradent Products Inc, USA) com o intuito de evitar o deslocamento do fio. Os incisivos inferiores dos animais foram cortados a cada 7 dias,⁴ para eliminar possíveis danos ao dispositivo de MDI (Fig. 1).

3.6 Obtenção das peças e processamento laboratorial

Após o período experimental, os animais foram submetidos à eutanásia por meio de dose excessiva de anestésico. As hemimaxilas do lado direito foram fixadas em formol tamponado a 10% por 24 horas e descalcificadas em solução de Plank-Rychlo a 10% por 8 dias. Após a descalcificação, as peças foram incluídas em parafina e montadas em blocos, submetidas aos cortes seriados no sentido longitudinal das raízes com 4 µm de espessura. Os cortes selecionados apresentavam a raiz disto-vestibular (RDV) com ápice aberto.

Foram obtidos três cortes por lâmina para cada espécime, os quais foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina. Para a análise quantitativa da MDI, análise histopatológica e análise semi-quantitativa das AH foi utilizado um microscópio óptico (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Alemanha). Para obtenção das fotomicrografias com aumento de 40x e 200x foi utilizada uma câmera digital (JVC, Victor Company of Japan, Ltd, Japan) acoplada ao microscópio. As imagens foram capturadas por meio do programa Leica Qwin Standard v 2.4 (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd, Cambridge, UK).

3.7.1 Análise quantitativa da movimentação dentária induzida

Para avaliação da quantidade de MDI as fotomicrografias (40x) com melhor definição para cada espécime foram utilizadas. A medida da menor distância entre a face distal do 1º MSD e a face mesial do 2º molar superior direito (2ºMSD) foi realizada com o programa Image J (1.45s/Java 1.6.0_20-32bits). Para obtenção da medida foram traçadas duas linhas verticais, uma tangenciando o ponto de maior convexidade da face distal da coroa do 1º MSD (T1) e a outra tangenciando o ponto de maior convexidade da face mesial da coroa do 2º MSD (T2), ambas perpendiculares a uma linha horizontal representativa do plano oclusal. Para medir a distância, traçou-se uma reta perpendicular entre as duas paralelas (d), que correspondeu à quantidade de MDI, incluindo a espessura de esmalte que foi descalcificado durante o processamento histológico (Fig. 2). A primeira avaliação foi verificar a normalidade de distribuição dos dados por meio do teste de Shapiro-Wilk com nível de significância de 5%, verificando-se a ocorrência de distribuição normal

(Anexo D). Em seguida procedeu-se a comparação entre as médias dos grupos com o teste Anova com nível de significância de 5%. Uma vez detectada presença de diferenças entre todas as médias, a comparação pareada entre elas foi realizada por meio do método de Holm-Sidak com nível de significância de 5%.

3.7.2 Erro do método intra-examinador para análise da quantidade de movimentação dentária induzida

Para esta avaliação foram coletadas medidas, e obtida a média e o desvio-padrão em um grupo escolhido de forma aleatória. Uma semana após o mesmo examinador realizou novas medidas no mesmo grupo, obtendo a média e respectivo desvio-padrão. As duas médias foram submetidas ao teste t e não foi verificada diferença significativa entre os dois intervalos (Anexo E).

3.8.1 Análise histopatológica e semi-quantitativa das áreas hialinas

Foi realizada uma análise descritiva dos aspectos histopatológicos presentes nas lâminas para caracterizar os grupos estudados quanto à formação das AH. Também foi desenvolvida uma análise semi-quantitativa das AH presentes no LP baseada em uma modificação de metodologia para análise de escores,⁸ sendo realizada duas vezes por um examinador calibrado nos 3 cortes histológicos obtidos para cada animal. Para os casos onde o espécime apresentou escores diversos para os diferentes cortes, o critério de escolha foi para o maior escore observado. Nos casos limítrofes entre dois escores para o mesmo corte, o menor escore foi pontuado.

A área de escolha para avaliação foi o LP da face mesial da RDV. O comprimento do LP (CLP) avaliado foi a distância entre a tangente que passa pelo ápice da face mesial da RDV (T3) até a tangente que passa pelo ponto mais inferior e distal da face mesial da RDV (T4). A avaliação linear das AH foi representada pelo comprimento de uma linha tendo como limite superior o ponto mais apical e o limite inferior o ponto mais cervical da AH. AH em desenvolvimento com presença de muitos núcleos celulares não foram consideradas válidas, apenas aquelas AH típicas, com ausência de núcleos celulares. Utilizou-se uma avaliação visual, de acordo com o seguinte escore: escore 1- ausência de AH; escore 2- AH suave comprometendo até 25% da extensão do LP; escore 3- AH moderada comprometendo de 25% a 50% da extensão do LP; escore 4- AH acentuada comprometendo de 50% a 75% da extensão do LP; escore 5- AH severa comprometendo mais de 75% da extensão do LP (Fig. 3).

Para analisar os escores atribuídos na avaliação da hialinização optou-se pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 1% e para comparação entre os grupos, foi utilizado o teste Dunn considerando-se o nível de significância de 5%.

3.8.2 Erro do método intra-examinador para análise das áreas hialinas

Para avaliação da confiabilidade e reprodutibilidade do método, a medição foi realizada por um examinador cego em relação aos testes realizados e resultados. O examinador realizou as análises em dois tempos diferentes, examinando as 70 lâminas, dez de cada grupo estudado, que foram aleatoriamente alteradas de suas posições originais da primeira para a

segunda avaliação (Anexo F). Em seguida, a concordância intra-examinador foi avaliada pelo teste estatístico Kappa. A determinação dos escores da hialinização por meio de uma análise visual conforme descrita mostrou-se confiável, já que o valor geral do teste estatístico Kappa foi de 0,836 (Anexo G e H).⁹

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa BioEstat5.3 (Manaus, AM, Brasil).

Resultados

4 Resultados

4.1 Análise quantitativa da movimentação dentária induzida

Os resultados referentes à quantidade de MDI obtida nos grupos são apresentados nas tabelas 1 e 2. Com base na avaliação entre as médias dos grupos estudados, verificou-se a ocorrência de diferenças estatisticamente significantes: todos os grupos submetidos à MDI mostraram-se diferentes em relação ao GC, com aumento da MDI. A quantidade de movimentação dentária observada no GM1 (399,7 μm) foi menor do que aquelas observadas nos grupos GM7 (598,5 μm), GM14 (669,6 μm) e GM21 (784,2 μm). No GM3 (472,4 μm) e no GM5 (499,16 μm) a MDI foi menor que no GM14 (669,6 μm) e GM21 (784,2 μm). O GM7 (598,5 μm) apresentou um deslocamento menor do que o GM21 (784,2 μm). Apesar das diferenças numéricas, as comparações entre as médias dos grupos GM7xGM3, GM7xGM5, GM5xGM1 e GM21xGM14 não foram estatisticamente significantes. O gráfico 1 mostra a média para quantidade de deslocamento dentário, o desvio-padrão e a diferença estatística entre os grupos (fig. 4).

4.2 Análise histopatológica

As características histopatológicas do periodonto mesial da RDV do 1º MSD dos ratos, com ênfase para a formação das AH, foram verificadas nos diferentes grupos experimentais:

- Grupo controle (GC)

O LP exibia aspectos de normalidade em todos os espécimes. A espessura do LP era uniforme em sua extensão, exibindo numerosos fibroblastos e fibras

colágenas que se inseriam de forma oblíqua na superfície radicular. O osso alveolar estava preservado, apresentando-se trabecular, com osteoblastos nas superfícies trabeculares e com espaços medulares preservados.

- Grupo movimentação 1 dia (GM1)

Havia nítida diminuição do espaço do LP com compressão dos fibroblastos e das fibras colágenas em toda extensão. Em apenas um espécime o LP não estava diminuído. AH foram detectadas em apenas dois espécimes e se caracterizavam por substância hialina (homogênea) eosinófila, sem estruturas nucleares em seu interior, ocupando no máximo 25% de extensão do LP da RDV. As AH estavam em continuidade com um LP comprimido, apresentando-se também hialino eosinófilo, porém com persistência de núcleos celulares viáveis, o que denominou-se “AH em desenvolvimento (AHd)”. Os demais espécimes do grupo apresentaram apenas AHd. Além disso, foi observado, em áreas focais, um íntimo contato da RDV com o osso alveolar, causando o desaparecimento do LP. Células gigantes multinucleadas, infiltrado inflamatório leve a moderado e hiperemia estiveram presentes principalmente no terço cervical do LP (Fig.5).

- Grupo movimentação 3 dias (GM3)

O LP estava comprimido em toda extensão, com desaparecimento dos fibroblastos e das fibras colágenas nos locais de grande compressão. Todos os espécimes apresentaram AH, exceto um. A extensão das AH em relação ao LP variou de 25% a 75%. As AH se desenvolveram geralmente no terço médio da RDV, e em poucos animais se estenderam até o terço apical e cervical. Havia muitas células gigantes multinucleadas e reabsorção óssea à distância

na face distal do osso trabecular. No terço cervical da raiz foram encontrados frequentemente infiltrado inflamatório moderado, hiperemia, restos epiteliais de Malassez e, em 3 animais, focos de reabsorção radicular (Fig.6).

- Grupo movimentação 5 dias (GM5)

No grupo GM5 houve diminuição da formação das AH. Em quatro animais sua extensão foi de, no máximo, 25% do LP. Nos locais sem substância hialina o ligamento periodontal apresentava características próximas da normalidade, contendo fibras colágenas e fibroblastos típicos da área. Na região do terço médio foram observadas extensas reabsorções ósseas junto a células gigantes multinucleadas, e o osso alveolar apresentava-se irregular e descontínuo. Reabsorções radiculares estavam presentes em 8 animais e foram encontradas com maior frequência no terço cervical da região estudada, assim como restos epiteliais de Malassez, hiperemia e infiltrado inflamatório leve (Fig.7).

- Grupo movimentação 7 dias (GM7)

Houve uma aparente diminuição do espaço do LP, principalmente nos terços médio e cervical, com compressão dos fibroblastos e fibras colágenas. Cinco animais apresentaram AH, a maioria delas envolvendo até 25% de extensão do LP da RDV e concentravam-se geralmente no terço médio. Em apenas um animal, a AH atingiu mais de 50% da extensão do LP. Na região cervical havia infiltrado inflamatório leve, hiperemia e restos epiteliais de Malassez. Fileiras de osteoblastos foram visualizadas ao redor das trabéculas ósseas remanescentes sugerindo que o processo ativo de reabsorção óssea estava em declínio com poucas células gigantes multinucleadas. Áreas de

reabsorção radicular estiveram presentes, algumas com grande extensão (Fig.8).

- Grupo movimentação 14 dias (GM14)

O LP exibia aspectos próximos da normalidade, com fibroblastos fusiformes e inserção das fibras colágenas de forma oblíqua com a raiz. Não foram encontradas AH nos espécimes. Linhas de reversão com neoformação óssea e reabsorções radiculares estavam presentes (Fig.9).

- Grupo movimentação 21 dias (GM21)

Semelhante ao GM14, este grupo apresentou LP com características histológicas próximas da normalidade, sem focos de AH. O tecido ósseo era mais homogêneo, exibindo linhas de reversão basofílicas e neoformação do componente mineral. O mesmo fato foi observado nos focos radiculares que sofreram reabsorção. Este quadro revelou um processo de regeneração do periodonto (Fig.10).

4.3 Análise semi-quantitativa das áreas hialinas

Com base na porcentagem de ocorrência das AH, verifica-se que a hialinização ocorreu nos grupos GM1, GM3, GM5 e GM7. Nos grupos GC, GM14, GM21 não foram detectadas AH. O grupo GM3 foi o que apresentou maior porcentagem para os escores mais graves quando somados: escore 3 (45%) e escore 4 (11%) e a menor porcentagem para o escore menos grave: escore 1 (11%), comparado aos outros grupos que foram submetidos à MDI. Os grupos GM5 e GM7 atingiram distribuições semelhantes para os diferentes

escores, exceto para o escore 4. Nenhum grupo atingiu o escore 5. O gráfico 2 representa a distribuição da ocorrência das AH nos grupos (Fig.11).

Na comparação entre os grupos foram detectadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos GM3xGC, GM3xGM14 e GM3xGM21. Desta forma as AH observadas no GM3 foram maiores do que as observadas nos grupos GC, GM14 e GM21. Nos demais comparações entre grupos, não houve diferenças estatisticamente significantes, conforme avaliação do teste Dunn, com nível de significância de 5% (Tabela 3, fig. 11).

Discussão

5 Discussão

A proposição deste trabalho foi descrever os eventos relativos à hialinização que ocorrem no LP, frente à MDI, no decorrer do tempo. De acordo com a literatura, a MDI possui as seguintes três fases: fase inicial e quase instantânea de movimentação dentária, causada pelo movimento abrupto do dente dentro do LP; fase de latência em que não se observa movimentação dentária consistente; e um período de aceleração ou movimentação dentária linear em que um movimento contínuo é observado.^{10,11} Conforme o esperado, neste estudo confirmou-se a ocorrência dessas três fases da MDI: o movimento dentário instantâneo ocorreu até o dia 1 (399,71 μ m) e uma fase de latência da MDI foi observada entre o primeiro dia e o dia 5, pois as diferenças observadas entre GM1 (399,71 μ m), GM3 (472,49 μ m) e GM5 (499,16 μ m) não foram significantes (Tabela 2, fig. 4). Nesta fase de latência foi observado o pico de formação das AH no dia 3, conforme o teste estatístico de Kruskal Wallis-Dunn, $p < 0.05$ (Fig. 11). Convém salientar que mesmo sendo considerada uma fase latente de MDI, sem diferenças estatisticamente significantes, ocorreu um pequeno deslocamento dentário, representado pelo aumento numérico da quantidade de MDI. Se neste momento o dente aproximou-se quase que totalmente do osso alveolar, comprimindo todo o LP, especula-se que alguma deflexão óssea esteja ocorrendo para diluir a força empregada, levando ao pequeno deslocamento dentário.^{12,13,14}

Ao dia 7 (598,50 μ m) um aumento significativo da taxa de MDI foi observado comparado ao primeiro dia (399,71 μ m). A partir deste momento, aumentos significantes da taxa de MDI ocorreram sucessivamente com o GM14 (669,68 μ m), que registrou valor significativamente maior do que GM 1, 3

e 5 e com o GM21 (784,25µm), que também registrou média maior do que GM1, 3, 5 e 7, demonstrando uma tendência de movimentação linear após o dia 7 de MDI (Tabela 2, fig. 4). Nota-se que após o dia 7 não foi observado a presença das AH (Fig. 11). Acredita-se que este movimento linear tardio, sem a presença de AH, tenha atingido o nível de saturação da resposta biológica inflamatória, e que o deslocamento dentário só seria interrompido com a total desativação da mola, podendo levar a danos irreparáveis tanto no osso alveolar como na superfície radicular.¹⁵

O período intercalado de sete dias mostrou-se limitado para evidenciar alterações significantes no deslocamento dentário, principalmente na fase tardia de MDI, já que o GM14 não foi diferente do GM7 e o GM21 do GM14. Sendo assim, sugere-se que períodos maiores de observação entre os grupos são necessários para apontar diferenças quando refere-se à quantidade de MDI. A média da quantidade de MDI mensurada nesse estudo está próxima aos valores de outros estudos.^{4,16}

Alterações na quantidade de formação das AH podem representar um tratamento dentro ou fora dos limites biológicos, diminuindo ou aumentando os danos ao LP, osso alveolar e raízes. A presença das AH nos períodos iniciais da MDI é um fato bem relatado por vários autores, porém a cronologia do processo de reparo das áreas hialinas ainda apresenta alguma controvérsia.⁵ Do ponto de vista qualitativo e semi-quantitativo demonstrou-se que ao primeiro dia as AH começaram a se desenvolver no LP em forma de segmentos de faixa vertical e exibiam ainda muitos núcleos celulares picnóticos em meio ao tecido eosinófilo, assim como relatado por outros autores.^{17,18} Ao dia 3 as AH eram típicas, com ausência de núcleos celulares, atingindo maiores extensões

do LP e demonstraram maior expressão com aumento estatisticamente significativo (Fig.11). Portanto, o dia 3 de experimento apresentou-se mais adequado para observar este fenômeno e testar protocolos de tratamento que podem interferir na formação das AH, diferentemente de outro trabalho¹⁹ onde as AH foram mais evidentes no período de 5 dias, o que pode ser explicado por diferenças metodológicas como diferenças na magnitude e tipo de força, idade dos ratos e tipo de corte histológico avaliado. Após o dia 3 as AH diminuíram em frequência e extensão, sendo que o dia 7 foi o último período a apresentar AH o que está de acordo com alguns estudos onde a remodelação do LP foi vista neste período.^{19,20} Ao dia 14 e ao dia 21 não foram detectadas AH, apesar de alguns autores encontrarem hialinização nos períodos tardios de MDI.²¹⁻²⁴ Portanto quanto à cronologia pode-se dizer que o GM1 representou o início de formação das AH, o GM3 apresentou as respostas mais marcantes que foram tornando-se mais brandas nos GM5 e GM7 até se tornarem ausentes no GM14 e GM21.

Vários trabalhos sugeriram que as AH são responsáveis pela fase de latência da MDI, pois sua presença impede o deslocamento dentário, que volta a ocorrer de forma linear após o completo reparo do LP.^{11,25-27} . Neste ponto cabe uma relação entre a ausência de AH e as taxas significativamente maiores de deslocamento dentário (GM14 e GM21) e presença de AH e taxas não significantes de MDI (GM1, GM3 e GM5) neste estudo. Sendo assim, o fenômeno de formação das AH pode estar relacionado com a fase de latência da MDI, o que pode ser indício de que as AH desempenham um papel importante sobre a taxa de MDI.

Algumas limitações deste estudo foram a perda de animais, corte histológico unidimensional de análise (longitudinal), variabilidade individual, único tipo e magnitude de força. Sugere-se a realização de novos estudos, com alterações na magnitude e tipo de força e o desenvolvimento de novas metodologias quantitativas para avaliar as AH, com objetivo de elucidar melhor o papel das AH na MDI.

Conclusão

6 Conclusão

De acordo com as condições experimentais deste estudo, concluiu-se que:

- A MDI apresentou restrição nos períodos iniciais (1-5 dias) e apresentou aceleração nos dias subsequentes (7-21 dias).
- As AH ocorreram nos períodos iniciais da MDI (1-7 dias) e não foram observadas em períodos subsequentes (14-21 dias).
- As AH apresentaram seu pico de formação aos 3 dias de MDI, sendo este o melhor período para sua observação.

Referências

Referências*

1. Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006;129:469e.1-460e.32.
2. Reitan K. Tissue behavior during orthodontic tooth movement. *Am J Orthod.* 1960;46:881-90.
3. Reitan K. Some factors determining the evaluation of force in orthodontics. *Am J Orthod.* 1957;43:32-45.
4. Kirschneck C, Proff P, Fanghaenela J, Behrb M, Wahlmann U, Roemera P. Differentiated analysis of orthodontic tooth movement in rats with an improved rat model and three-dimensional imaging. *Annals of Anatomy.* 2013;195:539–553.
5. Von Böhl M, Kuijpers-Jagtman AM. Hyalinization during orthodontic tooth movement: a systematic review on tissue reactions. *Eur J Orthod.* 2009;31:30-6.
6. Ren Y, Maltha JC, kuijpers-Jagtman AM. The rat as a model for orthodontic tooth movement- a critical review and proposed solution. *European Journal of orthodontics.* 2004;26:483-490.
7. Heller IJ, Nanda R. Effect of metabolic alteration of periodontal fibers on orthodontic tooth movement. An experimental study. *Am J Orthod.* 1979;75:239–58.
8. Martins-ortiz MF. Influência dos bisfosfonatos na movimentação dentária induzida, na frequência e nas dimensões das reabsorções radiculares associadas. 2004. 191 f. Tese (Doutorado Odontologia)–Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2004.

9. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33:159-174.
10. Wise GE, King GJ. Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. *J Dent Res*. 2008;87:414-434.
11. Gonzales C, Hotokezaka H, Arai Y, Ninomiya T, Tominaga J, Jang I, Hotokezaka Y, Tanaka M, Yoshida N. An in vivo 3D micro-CT evaluation of tooth movement after the application of different force magnitudes in rat molar. *Angle Orthod*. 2009;79:703-14.
12. Baumrind S. A reconsideration of the property of the pressure tension hypothesis. *Am J Orthod*. 1969;55:12-22.
13. Mostafa YA, Weaks-Dybrig M, Osdoby P. Orchestration of tooth movement. *Am J Orthod*. 1983;83:245-50.
14. Grimm FM. Bone bending, a feature of orthodontic tooth movement. *Am J Orthod*. 1972;62:384-93.
15. Alikhani M, Alyami B, Lee IS, Almoammar S, Vongthongleur T, Alikhani M, Alansari S, Sangsuwon C, Chou MY, Khoo E, Boskey A, Teixeira CC. Saturation of the biological response to orthodontic forces and its effect on the rate of tooth movement. *Orthod Craniofac Res*. 2015;18: 8–17.

16. 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. *Archives of oral biology*. 2015;60:776 –781
17. Brudvik P, Rygh P. Non-clast cells start orthodontic root resorption in the periphery of hyalinized zones. *European Journal of Orthodontics*. 1993;15:467–480.
18. Brudvik P, Rygh P. The initial phase of orthodontic root resorption incident to local compression of the periodontal ligament. *European Journal of Orthodontics*. 1993;15:249–263.
19. Fracalossi ACC, Santamaria JrM, Consolaro MFM-O, Consolaro AR. Movimentação dentária experimental em murinos: período de observação e plano dos cortes microscópicos. *Dental Press Ortodon Ortop Facial Maringá*. 2009;14:143-157.
20. Nakamura K, Sahara N, Deguchi T. Temporal changes in the distribution and number of macrophage-lineage cells in the periodontal membrane of the rat molar in response to experimental tooth movement. *Archives of Oral Biology*. 2001;46:593-607.
21. Brudvik P, Rygh P. Transition and determinants of orthodontic root resorption–repair sequence. *European Journal of Orthodontics*. 1995;17:177-188.
22. Vandevska-Radunovic V, Kvinnsland IH, Kvinnsland S. Effect of experimental tooth movement on nerve fibres immunoreactive to calcitonin

gene-related peptide, protein gene product 9.5, and blood vessel density and distribution in rats . *European Journal of Orthodontics*. 1997;19:517–529.

23. Iino S, Sakoda S, Ito G, Nishimori T, Ikeda T, Miyawaki S. 2007 Apr Acceleration of orthodontic tooth movement by alveolar corticotomy in the dog . *Am J of Orthod and Dent Orthop*. 2007;131:448.e1-8.

24. Von Böhl M, Maltha JC, Von den Hoff JW, Kuijpers-Jagtman AM. Changes in the periodontal ligament after experimental tooth movement using high and low continuous forces in beagle dogs. *Angle Orthodontist*. 2004;74:16-25.

25. Reitan K. Effects of force magnitude and direction of tooth movement on different alveolar bone types. *Angle Orthod*.1964;34:244–255.

26. Brudvik P, Rygh P. Root resorption beneath the main hyalinized zone. *Eur J Orthod*.1994;16:249–263.

27. Brudvik P, Rygh P. Multi-nucleated cells remove the main hyalinized tissue and start resorption of adjacent root surfaces. *Eur J Orthod*.1994;16:265–273.

Figuras

Figura 1 - Dispositivo instalado para MDI.



Figura 2 - Fotomicrografia utilizada para cálculo quantitativo da MDI. Primeiro molar superior direito (1°MSD), segundo molar superior direito (2°MSD), tangente um (T1), tangente dois (T2), distância avaliada (d- linha vermelha).

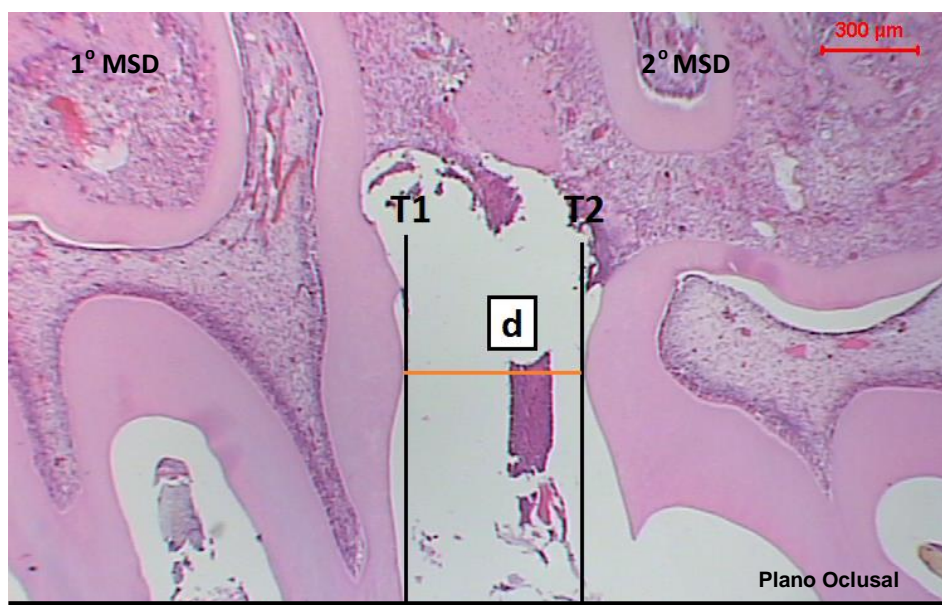


Figura 3 - Representação da metodologia visual utilizada na análise de escores das AH. Sentido da força (Seta vermelha), área avaliada (retângulo vermelho), ausência de AH (Escore 1), até 25% de AH (escore 2), de 25% a 50% de AH (escore 3), de 50% a 75% de AH (escore 4), mais de 75% de AH (escore 5), tangente superior (T3), tangente inferior (T4), comprimento do ligamento periodontal (CLP), raiz disto-vestibular (RDV).

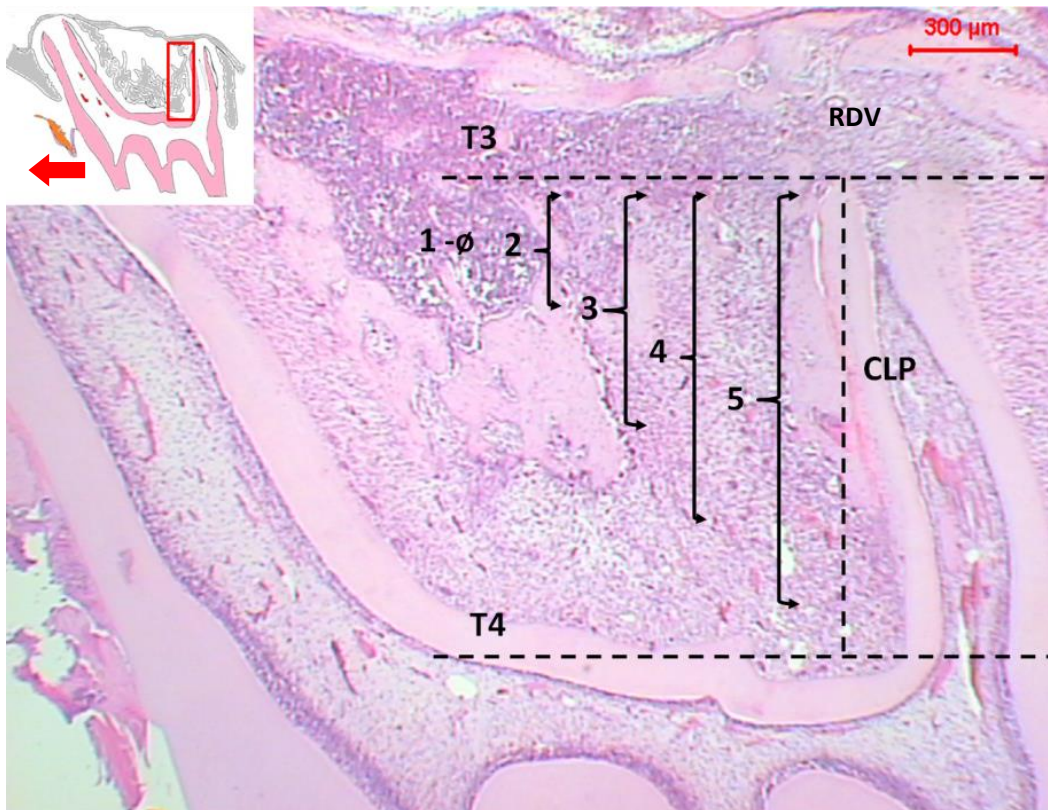


Figura 4 - Gráfico 1 - Média, desvio-padrão e diferença estatística para quantidade de MDI (μm) por grupo (Anova- Holm Sidak, $p < 0.05$).

Grupos com letras iguais não possuem diferenças estatisticamente significantes, $p < 0.05$

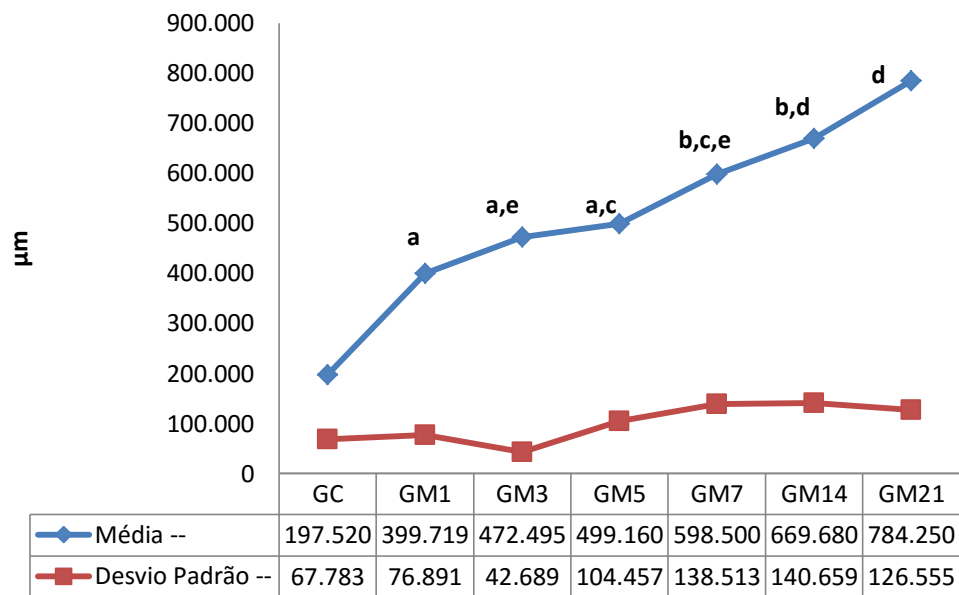
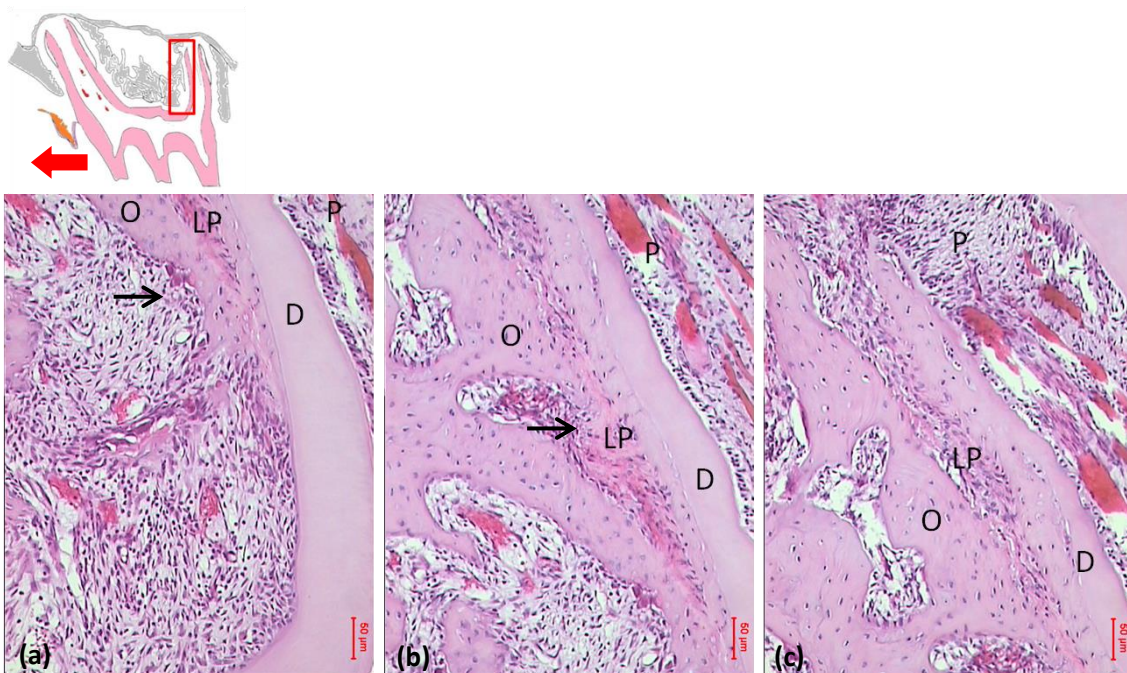


Figura 5 - Grupo GM1 - periodonto da face mesial da RDV: (a) terço cervical exibindo reabsorção óssea (seta) e infiltrado inflamatório moderado; (b) terço médio evidenciando compressão e AHd (seta); (c) terço apical com periodonto comprimido.



O= osso alveolar, D= dentina, P= polpa, LP= ligamento periodontal

Figura 6 - Grupo GM3 - periodonto da face mesial da RDV: (a) terço cervical exibindo reabsorção óssea à distância, infiltrado inflamatório moderado, AH (seta) e hiperemia; (b) terço médio e (c) terço apical evidenciando compressão do LP, AH (setas) e reabsorção óssea à distância.

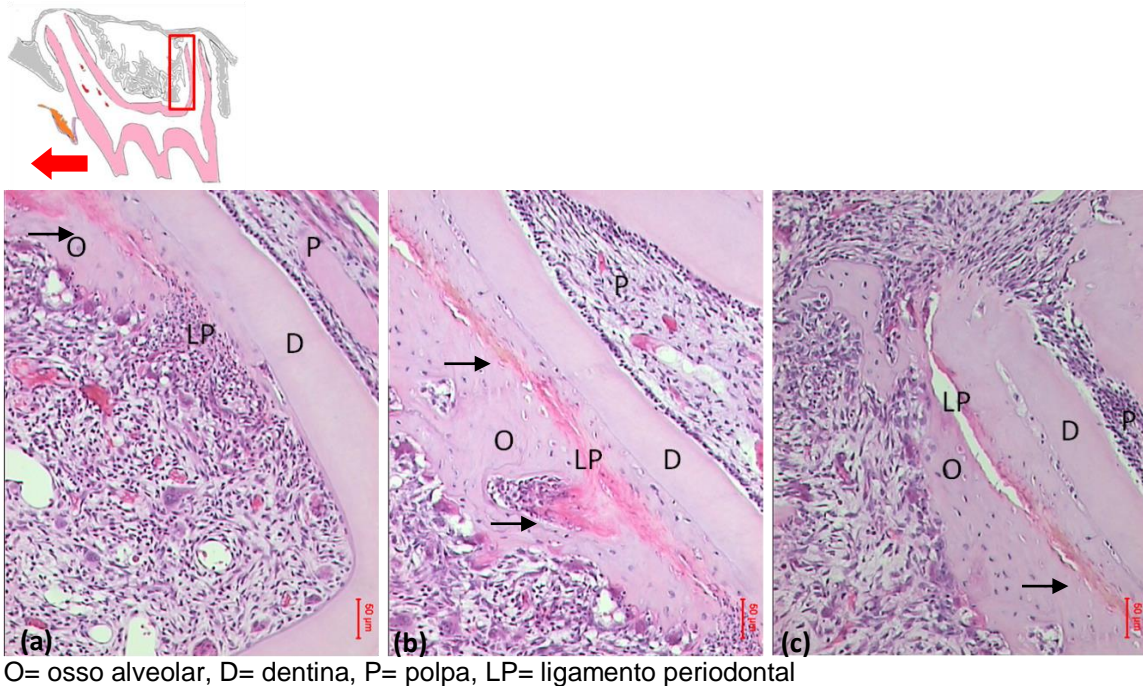


Figura 7 - Grupo GM5 - periodonto da face mesial da RDV: (a) terço cervical exibindo início de reabsorção radicular (seta) e perda óssea; (b) terço médio e (c) terço apical exibindo LP com aspecto de normalidade e presença de células gigantes multinucleadas (seta).

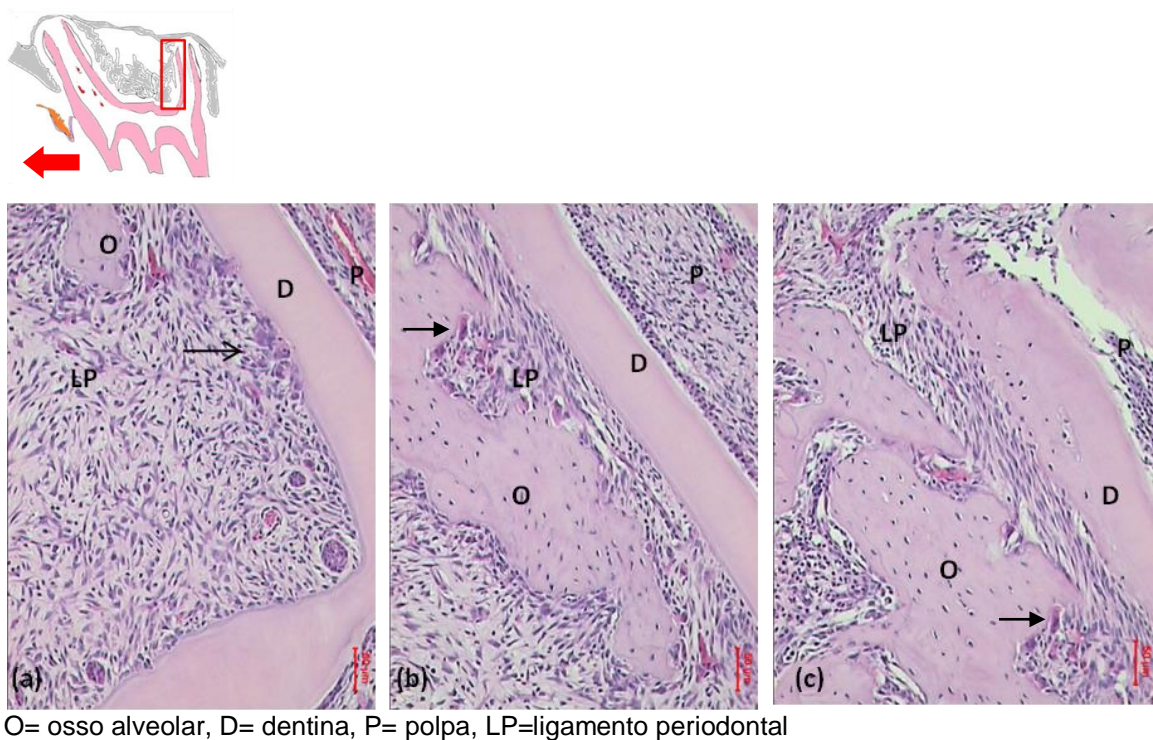


Figura 8 - Grupo GM7 - periodonto da face mesial da RDV: (a) terço cervical exibindo reabsorção radicular, AH (seta); (b) terço médio evidenciando compressão do LP e AH (seta); (c) terço apical com periodonto exibindo aspecto próximo a normalidade.

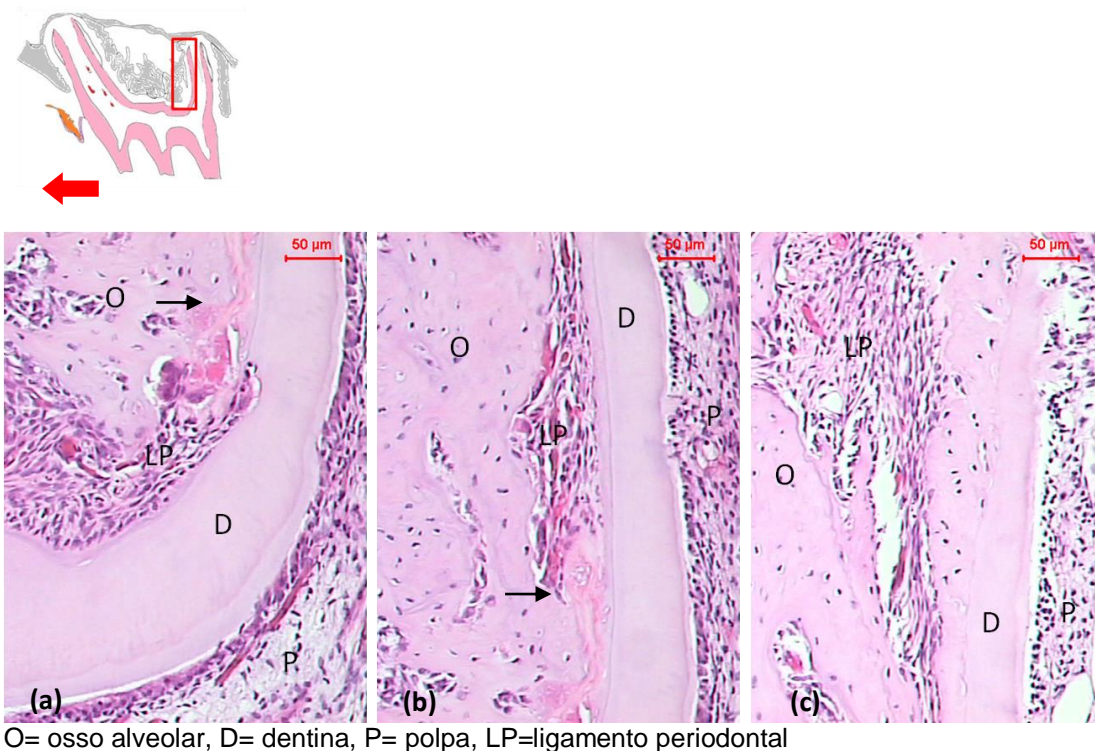


Figura 9 - Grupo GM14 - periodonto da face mesial da RDV: (a) terço cervical e (b) terço médio exibindo reabsorção radicular (seta); (c) terço apical com periodonto exibindo normalidade e linhas de reversão no tecido ósseo (seta).

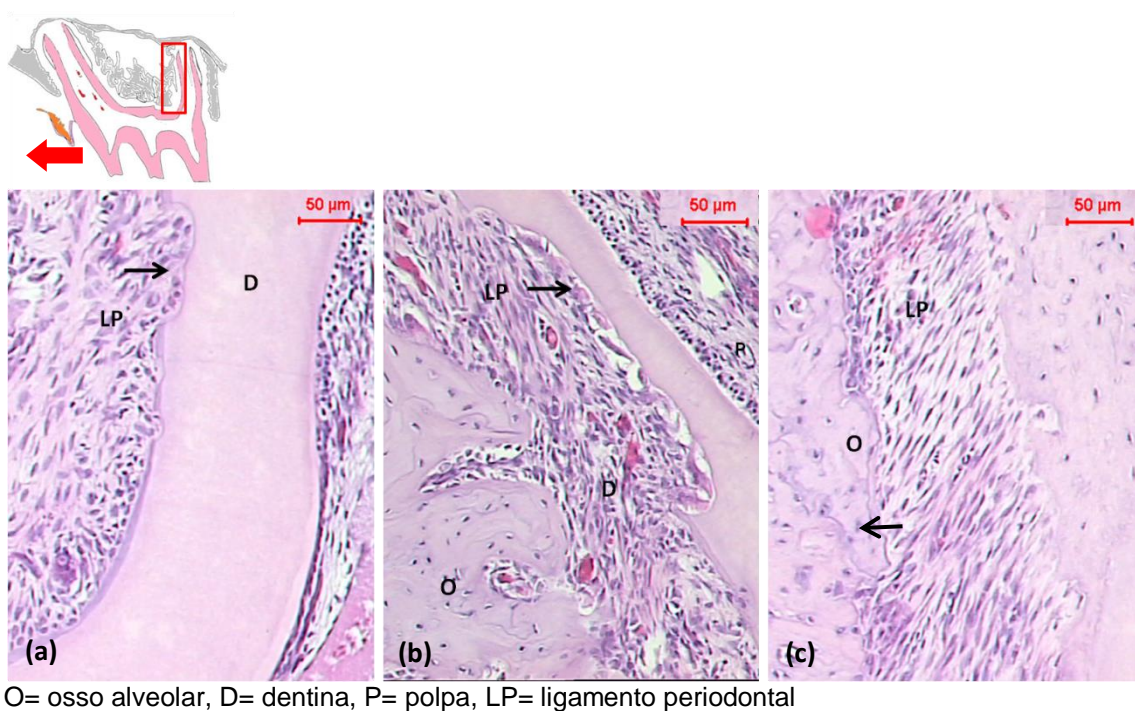
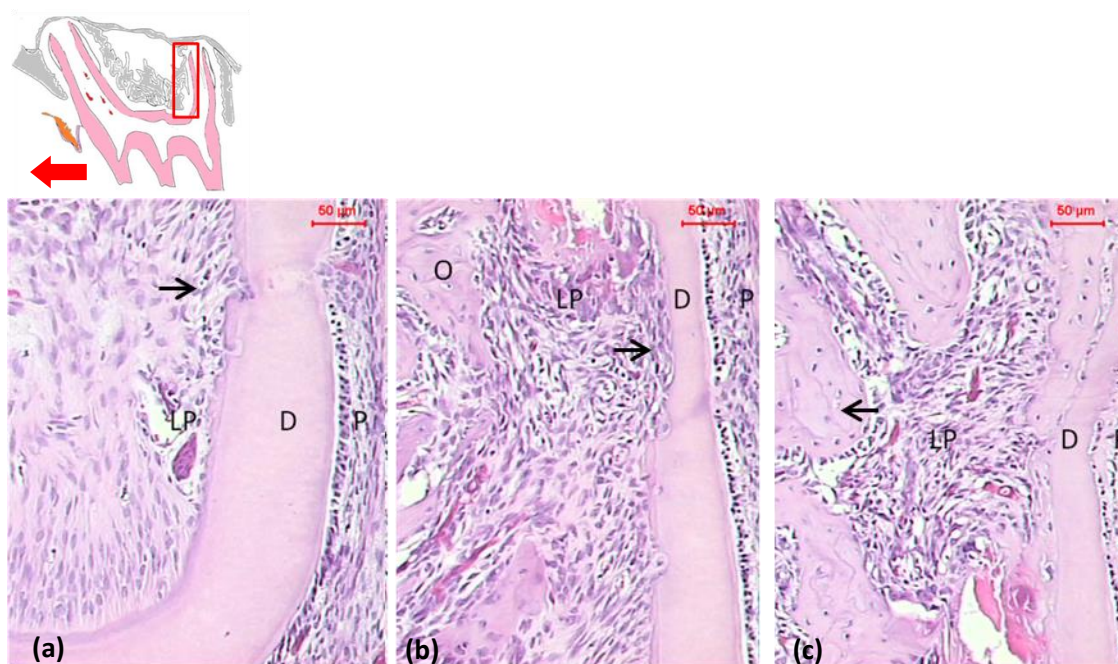
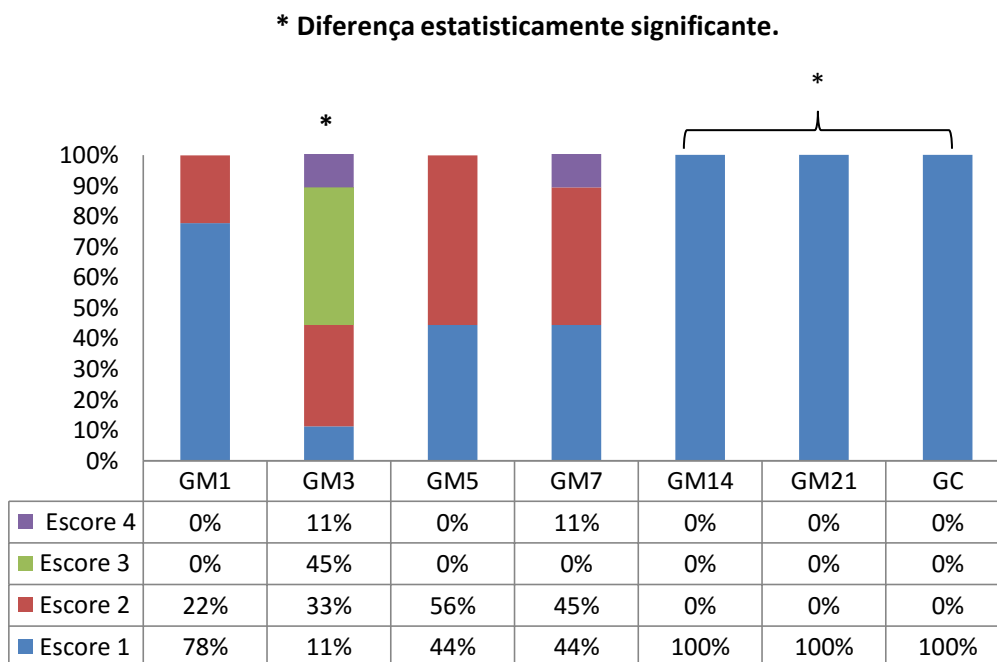


Figura 10 - Grupo GM21 - periodonto da face mesial da RDV: (a) terço cervical exibindo reabsorção radicular (seta); (b) terço médio com periodonto exibindo normalidade e reabsorção radicular (seta); (c) terço apical exibindo linhas de reversão no osso alveolar.



O= osso alveolar, D= dentina, P= polpa, LP= ligamento periodontal

Figura 11 - Gráfico 2 - Porcentagem e diferença estatística na análise de escores das AH por grupo (Kruskal Wallis - Dunn, $p < 0.05$).



Tabelas

Tabela 1 - Média e desvio-padrão (DP) da quantidade de MDI por grupo em unidades de micrometros (μm).

Grupo	GC	GM1	GM3	GM5	GM7	GM14	GM21
Média (μm)	197,520	399,719	472,495	499,160	598,500	669,680	784,250
DP (μm)	67,783	76,891	42,689	104,457	138,512	140,659	126,555

Tabela 2 - Análise estatística de comparação entre os grupos para a quantidade de MDI (Teste Anova – Holm Sidak, $p < 0,05$).

Comparações	Diferença entre médias (μm)	t	p	p<0,05
GM21 x GC	586,730	11,741	<0,001	s
GM14 x GC	472,160	10,021	<0,001	s
GM7 x GC	400,980	7,723	<0,001	s
GM21 x GM1	384,531	7,300	<0,001	s
GM5 x GC	301,640	6,036	<0,001	s
GM21 x GM3	311,755	5,918	<0,001	s
GM3 x GC	274,975	5,502	<0,001	s
GM21 x GM5	285,090	5,412	<0,001	s
GM14 x GM1	269,961	5,402	<0,001	s
GM1 x GC	202,199	4,046	0,002	s
GM14 x GM3	197,185	3,946	0,003	s
GM7 x GM1	198,781	3,646	0,006	s
GM14 x GM5	170,520	3,412	0,011	s
GM21 x GM7	185,750	3,407	0,010	s
GM7 x GM3	126,005	2,311	0,161	ns
GM21 x GM14	114,570	2,293	0,146	ns
GM5 x GM1	99,441	1,888	0,284	ns
GM7 x GM5	99,340	1,822	0,265	ns
GM3 x GM1	72,776	1,382	0,434	ns
GM14 x GM7	71,180	1,371	0,321	ns
GM5 x GM3	26,665	0,506	0,615	ns

(s) diferença significativa, (ns) diferença não significativa.

Tabela 3 - Resultado do teste estatístico de Kruskal Wallis - Dunn para as comparações entre os grupos, com base na análise de escores das AH ($p < 0,05$).

Comparações (método de Dunn)	Dif. Postos	z calculado	z crítico	p
GC x GM1	6.2222	0.7162	3.038	ns
GC x GM3	32.5	3.741	3.038	< 0.05
GC x GM5	13.3889	1.5412	3.038	ns
GC x GM7	20.1111	2.315	3.038	ns
GC x GM14	0	0	3.038	ns
GC x GM21	0	0	3.038	ns
GM1 x GM3	26.2778	2.9482	3.038	ns
GM1 x GM5	7.1667	0.8041	3.038	ns
GM1 x GM7	13.8889	1.5582	3.038	ns
GM1 x GM14	6.2222	0.7162	3.038	ns
GM1 x GM21	6.2222	0.6981	3.038	ns
GM3 x GM5	19.1111	2.1441	3.038	ns
GM3 x GM7	12.3889	1.39	3.038	ns
GM3 x GM14	32.5	3.741	3.038	< 0.05
GM3 x GM21	32.5	3.6463	3.038	< 0.05
GM5 x GM7	6.7222	0.7542	3.038	ns
GM5 x GM14	13.3889	1.5412	3.038	ns
GM5 x GM21	13.3889	1.5021	3.038	ns
GM7 x GM14	20.1111	2.315	3.038	ns
GM7 x GM21	20.1111	2.2563	3.038	ns
GM14 x GM 21	0	0	3.038	ns

(ns) diferença estatisticamente não significativa, (<0,05) diferença significativa

Anexos

Anexo A - Normas do periódico *The Angle Orthodontist* selecionado para a publicação do artigo.

Please be aware that *The Angle Orthodontist* participates in the CrossCheck™ initiative and that all submissions are subject to screening with iThenticate software to detect plagiarism.

Please organize and enter your Original Article manuscript using the following headings (Case reports and other types of articles may vary):

COVER LETTER - Must contain the following:

Copyright Releases - The following written statement, signed by one of the authors and acting on behalf of all of the authors, must accompany all manuscripts:

"The undersigned author transfers all copyright ownership of the manuscript (fill in the title of your manuscript) to *The Angle Orthodontist* in the event the work is published. The undersigned author warrants that the article is original, is not under consideration for publication by another journal and has not been previously published. I sign for and accept responsibility for releasing this material on behalf of *any* and all coauthors."

Direct quotations, tables or images that have appeared elsewhere in copyrighted material must be accompanied by a signed release from the copyright owner. Complete information identifying the source of the material is required.

Patient Releases - A signed release must be obtained for all images that contain identifiable patients or human subjects. These releases must be retained indefinitely by the Corresponding Author. A cover letter must be submitted with the manuscript attesting to the fact that all applicable patient releases were obtained and are on file with the Corresponding Author.

Each release statement must be on a separate page, include the manuscript title, all authors' names and contain a copy of the following statement signed by the patient:

"I hereby grant all rights to publish photographs or other images of me in the above manuscript where I appear as a patient or subject without payment of any kind. I have been informed that any images of me that do appear may be modified."

- **ARTICLE FILE**

Articles must be original and written in clear English. The total article file must be entered as one document and must contain the Title, Abstract, Text References and Figure Legends. The article file must not exceed a maximum of 3500 words. To determine the number of words in your document, go to the toolbar, click on tools and then click on word count.

For Systematic Reviews, use the PRISMA statement for uniformity in reporting format: (<http://www.prisma-statement.org/2.1.2%20-%20PRISMA%202009%20Checklist.pdf>). Follow the proposed structure and subheadings whenever possible.

Please enter only the following items in the article file:

- **Title** of the manuscript

- **Abstract** - *The Angle Orthodontist* is using a structured abstract which must be limited to 250 words. The abstract should conform to the following outline and not contain an introduction, literature review or discussion.

ABSTRACT

Objective: List the specific goal(s) of the research.

Materials and Methods: Briefly describe the procedures you used to accomplish this work. Leave the small details for the manuscript itself.

Results: Identify the results that were found as a result of this study.

Conclusion: List the specific conclusion(s) that can be drawn based on the results of this study.

- **Manuscript text** - Please remove all references to the author's identity or institutions as manuscripts are peer reviewed anonymously. An original article text will contain the following in order:

INTRODUCTION - This section states the purpose of the research and includes a brief summary of the literature describing the current state of the field.

MATERIALS AND METHODS - This section states exactly what was done and should enable a reader to replicate the work. Materials or methods described elsewhere in the literature can be referenced without repeating these details. Identify teeth using the full name of the tooth or the FDI annotation. If human subjects or animals were involved in the work, this section must contain a statement that the rights of the human or animal subjects were protected and approval was obtained from an identified institutional review board, or its equivalent.

RESULTS - This section should describe the objective findings without any comment on their significance or relative importance. Cite all tables and figures in sequential order in the text.

DISCUSSION - Only this section allows you freedom to interpret your data and to give your opinion of the value of your findings relative to previous work. All opinions must be limited to this section.

CONCLUSION - This section states what conclusions can be drawn specifically from the research reported. Bullet points are preferred. Do not repeat material from other sections..

REFERENCES - References cited must refer to published material. Number references consecutively in order of their appearance in the manuscript using superscript and Arabic numerals. References to "personal communication" or unpublished theses are not acceptable. The style and punctuation of references should strictly conform to *American Medical Association Manual of Style: A Guide for Authors and Editors*, 9th ed (Baltimore, Md: Williams & Wilkins; 1998). Consult previous issues of *The Angle Orthodontist* for guidance (Available at <http://www.angle.org>).

FIGURE LEGENDS - All figures must be numbered sequentially in the manuscript and a legend for each figure must appear in this section.

- **TABLE FILES**

Each table must be in WORD or EXCEL format and entered as a separate file. Each table must have its own legend accompanying it, numbered with Arabic numerals and sequentially referred to in the text. All abbreviations used in the table must be defined in a footnote. Use * $P=0.05$; ** $P=0.01$; *** $P=0.001$; **** $P=0.0001$ as needed. Tables cannot be

in pictorial or image formats. Pictorial or image formats are figures and must be entered as figures.

- **FIGURE FILES**

Each figure must be of sufficient resolution for high quality publication usually in TIFF or EPS format. All images need to be at 300 DPI when the figure is of the size to be used in publication.

If you enter a large image at 300 DPI and reduce it to a much smaller size for publication, this will increase the DPI and the image will be very heavy and slow to open electronically. If you enter a small image (such as a 35 mm picture) and plan to enlarge it for publication, it needs to be entered at more than 300 DPI since enlargement will only reduce the resolution.

Figures in WORD or presentation software such as PowerPoint, Corel Draw or Harvard Graphics do not contain sufficient resolution for publication and will not be accepted. Authors will be charged for publication of figures in color.

Manuscript Review

After you have entered your manuscript, you will receive automated responses from the system as the manuscript is processed. You may also follow the progress of your manuscript via the web site and your own password you created when you first entered the system.

Your manuscript will be peer reviewed and the reviewers' comments will be sent to you. Please allow adequate time for this process. Our automated system is instantaneous, but the reviewers are busy people who donate their expertise and time.

A manuscript returned to an author with suggested revisions must be returned within 3 months. Revised manuscripts returned after this time will be considered new submissions.

After the revisions are complete, the editor will submit the manuscript to the printer and an electronic copy of your galley proof will be sent to you for corrections and final approval. Expect the figures in the galley proof to be of low resolution for ease of transmission. The final publication will contain your high quality figures.

Reprints

Reprints are available through special order for a nominal charge. Your galley copy will contain an order form for you to request any reprints desired. When you complete this application, return it directly to the printer. Reprints are not sent out or billed to you until the printed copy of your article is mailed out.

General Information

The E. H. Angle Education and Research Foundation invites manuscripts concerning the dental and craniofacial complex. Original research, clinical observations and review articles as well as guest editorials, letters to the editor and case reports are welcome. Articles are peer reviewed through a double-blind process and are subject to editorial revision. Statements and opinions expressed in articles are not necessarily those of the editor or publisher. The editor and the publisher disclaim any responsibility or liability for such material. *The Angle Orthodontist* is now ONLINE for all manuscript submissions and review. Please go to the Internet: <http://angle.allentrack.net/> and follow the easy instructions for manuscript submission. If you have questions regarding the submission of your manuscript, please e-mail those questions to <rjisaacson@aol.com>

Anexo B - Certificados do Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Frequência das alterações histopatológicas no ligamento periodontal decorrentes dos períodos iniciais da movimentação dentária ortodôntica**", Processo FOA nº 2014-00813, sob responsabilidade de Marcos Rogério de Mendonça apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 02 de Setembro de 2014.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 10 de Setembro de 2016.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 10 de Outubro de 2016.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Frequency of histopathological events in periodontal ligament arising from early periods of tooth movement**", Protocol FOA nº 2014-00813, under the supervision of Marcos Rogério de Mendonça presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on September 02, 2014.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: September 10, 2016.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: October 10, 2016.


Prof. Dr. Maria Gisela Laranjeira
Coordenadora da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação histopatológica dos períodos tardios da movimentação dentária ortodôntica em molares murinos**", Processo FOA nº 2014-00814, sob responsabilidade de Marcos Rogério de Mendonça apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 02 de Setembro de 2014.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 10 de Setembro de 2016.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 10 de Outubro de 2016.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Histopathological evaluation in late periods of orthodontic tooth movement in murine molars**", Protocol FOA nº 2014-00814, under the supervision of Marcos Rogério de Mendonça presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on September 02, 2014.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: September 10, 2016.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: October 10, 2016.


Prof. Dra. Maria Gisela Laranjeira
Coordenadora da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

Anexo C - Formação dos grupos.

GRUPO	MDI
GC	Ausente
GM1	1 dia
GM3	3 dias
GM5	5 dias
GM7	7 dias
GM14	14 dias
GM21	21 dias

MDI- movimentação dentária induzida

Anexo D - Teste de normalidade de Shapiro- Wilk para os dados referentes à quantidade de MDI.

<p>p = 0,391 amostra normal</p>

Anexo E – Erro do método intra-examinador para análise da quantidade de MDI (teste t).

	Tempo 1	Tempo 2
Tamanho =	10	10
Média =	416.552	416.5551
Variância =	6829.0927	6851.6374
	Homocedasticidade	---
Variância =	6840.365	---
t =	-0.0001	---
Graus de liberdade =	18	---
p (unilateral) =	0.5	---
p (bilateral) =	0.9999	---
Poder (0.05)	0.0377	---
Poder (0.01)	0.086	---

Diferença entre as médias =	-0.0031	---
IC 95% (Dif. entre médias) =	-77.7138 a 77.7076	
IC 99% (Dif. entre médias) =	-106.4530 a	106.4468

Anexo F – Escores atribuídos pelo examinador para análise das AH no tempo 01 e no tempo 02.

Animal	Tempo 01							Tempo 02						
	GM1	GM3	GM5	GM7	GM14	GM21	GC	GM1	GM3	GM5	GM7	GM14	GM21	GC
1	2	3	2	2	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1
2	X	3	1	1	1	1	1	X	3	1	1	1	1	1
3	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1
4	1	3	1	X	1	1	1	1	2	1	X	1	1	1
5	1	4	2	1	1	1	1	1	3	2	1	1	1	1
6	1	3	1	2	1	1	1	1	3	1	2	1	1	1
7	2	3	2	2	1	1	1	2	3	2	1	1	1	1
8	1	4	1	1	1	X	1	1	4	1	1	1	X	1
9	1	X	3	2	1	1	1	1	X	2	2	1	1	1
10	1	2	X	4	1	1	1	1	2	X	4	1	1	1

x- Leitura inviável da lâmina, amostra descartada.

Anexo G - Erro geral do método de avaliação por escores das AH.

Kappa geral	0.836
P-valor geral	< 0.001
Intervalo de 95% de confiança do Kappa	sup.: 1.0 inf.: 0.662

Anexo H - Erro do método de avaliação por escores das AH.

	Escore 1	Escore 2	Escore 3	Escore 4
Kappa da categoria	0.963	0.796	0.568	0.792
P-valor do Kappa da categoria	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Intervalo de 95% de confiança do Kappa da categoria	sup.: 1.0 inf.: 0.72	sup.: 1.0 inf.: 0.554	sup.: 0.805 inf.: 0.331	sup.: 1.0 inf.: 0.555
Interpretação Concordância	Quase perfeita	Substancial	Moderada	Substancial

Values of Kappa	Interpretation
<0	No agreement
0-0.19	Poor agreement
0.20-0.39	Fair agreement
0.40-0.59	Moderate agreement
0.60-0.79	Substantial agreement
0.80-1.00	Almost perfect agreement

Fonte: Landis JR, Koch GG. *The measurement of observer agreement for categorical data*. Biometrics 1977; 33: 159-174